

# **MODIFIOIDUN SIMONS' STAINING- MENETELMÄN SOVELTUVUUS SELLUNÄYTTEIDEN ANALYSOINTIIN**

Susanna Salonen

Opinnäytetyö  
Joulukuu 2012  
Laboratorioalan koulutusohjelma

## TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Laboratorioalan koulutusohjelma

SUSANNA SALONEN:

Modifioidun Simons' Staining-menetelmän soveltuvuus sellunäytteiden analysointiin

Opinnäytetyö 67 sivua, josta liitteitä 8 sivua  
Joulukuu 2012

---

Tämä opinnäytetyö on tehty Tampereen teknillisen yliopiston Materiaaliopin laitokselle Kuitumateriaalitekniikan yksikössä. Työn tarkoituksena oli tutkia soveltuuko modifioitu Simons' Staining-menetelmä valittujen sellunäytteiden huokoskoon analysointiin. Työssä värjättiin kahta erilaista sellunäytettä, mekaanisesti käsiteltyä ja käsittelemätöntä ja ennakko-oletuksena oli, että näytteiden välillä havaittaisiin selvä ero. Kun sellua käsiteltiin mekaanisesti, sellun alttius entsyymaattiselle pilkkoutumiselle kasvaa, joten sen oletetaan adsorboivan enemmän oranssia kuin sinistä väriä. Mittaukset suoritettiin UV-Vis-spektrofotometrillä. Ongelmina olivat taustatietona toimineiden kirjallisuusviitteiden puutteellinen tieto ja omien mittausten ristiriitaisuus kirjallisuuden arvoihin.

Sellunäytteiden värjäystestit jaettiin kolmeen kokonaisuuteen erilaisten muuttujien mukaan, jotka olivat sellukonsentraatio, värin konsentraatio ja värjäysaika. Tulokseksi saatiin, että sellukonsentraatio 1 wt% adsorboi parhaiten väriä testatuista sellukonsentraatioista. Värin konsentraation ollessa muuttujana saatiin tulokseksi, että laimeampi värikonsentraatio oli parempi, mutta värjäyksen parametreja pitää vielä hioa. Värjäysajan ollessa muuttujana, tuloksiin ei saatu merkittäviä eroja, joten värjäysajaksi valittiin 60 minuuttia. Verrattaessa mekaanisesti käsiteltyä ja käsittelemätöntä sellua, ei niiden välillä nähty suurta eroa.

Työn tavoite saavutettiin, koska menetelmän tutkimus saatiin hyvään alkuun. Työn tuloksena oli, ettei testattu menetelmä sovellu tutkittujen sellunäytteiden analysointiin. Menetelmän tutkiminen jatkuu vielä tämän työn valmistumisen jälkeen. Seuraavaksi kannattaisi tutkia, miten kuivattu sellu käyttäytyy värjätessä, koska sellun kuivuessa huokosten tiedetään romahtavan pysyvästi. Värien affiniteettia selluun voisi testata värjäämällä sellua yksittäisillä väreillä. Myös värjäysliuoksen värien suhteen muuttamista sekä erilaisia sellunäytteitä voisi kokeilla.

---

Asiasanat: Simons' Staining, kaksikomponenttivärjäys, selluloosa, huokosrakenne

## ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu  
Tampere University of Applied Sciences  
Degree Programme in Laboratory Science

SUSANNA SALONEN:

The Feasibility of Modified Simons' Staining Technique for Analysing Cellulose

Bachelor's thesis 67 pages, appendices 8 pages  
December 2012

---

This thesis has been made for the Material Science Department of Tampere University of Technology, specifically for the Fibre Materials Science operational group. The purpose of this thesis was to study the feasibility of modified Simons' Staining Technique for analyzing the pore size of selected cellulose. Two cellulose samples were stained, mechanically treated and untreated cellulose. The presumption was that the difference between the samples would be significant, because mechanical treatment should increase the pore size and therefore adsorb more orange color than blue color. The lack of information in the literary references and the inconsistency between measurements and the values in literature created problems in this thesis.

The staining tests were separated in three sections with different variables: the concentration of cellulose, the concentration of dyes and staining time. In this thesis, it was revealed that 1 wt% of cellulose is the best of the tested concentrations of cellulose. The results were inconsistent when the concentration of dye was the variable, intake was proportionally better from the diluted dye solution, but absolutely more dyes were adsorbed from the concentrated solution. No significant differences were found with staining time. When mechanically treated and untreated cellulose were compared, no significant difference was found.

The goal of this thesis was reached and the results indicate that the tested method is not feasible for analyzing the pore size of the tested cellulose. The research continues after this work. A prospective test could be staining dried cellulose, because when cellulose is dried hornification occurs. The affinity of the colors could be tested by staining cellulose with only one color instead of two. Different ratios of the colors and different cellulose samples could also be tested.

---

Key words: Simons' Staining, two-component dye, cellulose, pore structure

## SISÄLLYS

1	JOHDANTO.....	6
2	TEORIA .....	7
2.1	Selluloosa.....	7
2.2	UV-Vis-spektrofotometria .....	10
2.3	Lambert-Beerin laki .....	13
2.4	Simons' Staining-menetelmä.....	14
3	KOKEELLINEN OSUUS .....	17
3.1	Materiaalit .....	17
3.1.1	Sellut .....	17
3.1.2	Värit.....	18
3.1.3	PBS-puskuri .....	18
3.1.4	Pyridiini.....	18
3.2	Menetelmät .....	19
3.2.1	Väriliuosten valmistus.....	19
3.2.2	Väriliuosten spektrit .....	20
3.2.3	Standardisuorat.....	22
3.2.4	Sellujen kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen .....	25
3.2.5	Sellunäytteiden värjäys .....	25
3.2.5.1	Muuttujana sellukonsentraatio .....	27
3.2.5.2	Muuttujana värin konsentraatio .....	27
3.2.5.3	Muuttujana värjäysaika .....	27
3.3	Tulokset .....	28
3.3.1	Väriliuosten valmistaminen .....	28
3.3.2	Väriliuosten spektrit .....	29
3.3.3	Standardisuorat.....	37
3.3.4	Sellujen kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen .....	39
3.3.5	Sellunäytteiden värjäys .....	40
3.3.5.1	Muuttujana sellukonsentraatio .....	40
3.3.5.2	Muuttujana värin konsentraatio .....	43
3.3.5.3	Muuttujana värjäysaika .....	50
4	SELLUNÄYTTEIDEN VÄRJÄYSTEN TULOSTEN YHTEENVETO .....	55
5	POHDINTA.....	57
	LÄHTEET .....	59
	LIITTEET .....	60
	Liite 1. PBS-puskurin valmistus.....	60
	Liite 3. Sellunäytteiden kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen .....	64

Liite 4. Reagenssien määrät, kun muuttujana on sellukonsentraatio.....	65
Liite 5. Reagenssien määrät, kun muuttujana on värin konsentraatio.....	66
Liite 6. Reagenssien määrä, kun muuttujana on värjäysaika.....	67

## 1 JOHDANTO

Tässä opinnäytetyössä tutkittiin mahdollisuutta käyttää modifioitua Simons' Staining (SS)-menetelmää selluloosanäytteiden analysoimiseen. Tavoitteena on testata muuttaako selluloosan mekaaninen käsittely SS-menetelmässä käytettyjen värien adsorptiota, jolloin menetelmää voisi käyttää selluloosan huokoskoon tutkimiseen. Työssä keskitytään modifioituun SS-menetelmään, joten alkuperäinen menetelmä on rajattu lähes kokonaan tämän työn ulkopuolelle.

Työ on tehty Tampereen teknillisen yliopiston Materiaaliopinlaitoksen Kuitumateriaalitekniikan yksikölle. Työn ohjaajana toimi projektipäällikkö Marianna Vehviläinen.

Työ on jaettu teoria-, kokeellinen-, tulos- ja pohdintaosioon. Teoriaosiossa esitellään selluloosaan rakenne, viskoosin valmistusmenetelmä ja käytetty laitte, UV-Vis-spektrofotometri sekä Lambert-Beerin laki ja tulosten laskemiseen tarvittavat kaavat ja myös Simons' Staining-menetelmän periaatteet ja esitellään FuBio-projektin tarkoitus ja tavoitteet. Kokeellinen osuus on jaettu materiaaleihin, menetelmiin ja tuloksiin. Materiaaliosiossa kerrotaan mitä reagensseja ja näytteitä käytettiin. Menetelmäsiossa käydään läpi kaikki käytetyt menetelmät eli väriliuosten valmistus ja pitoisuuden tarkistus, väriliuosten spektrit, standardisuorat, sellujen kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen ja värjäys. Kokeellisen osion tuloksissa esitetään kaikki saadut tulokset. Värjäysten tulokset vedetään yhteen varsinaisessa tulososiossa ja pohdinnassa esitetään ajatuksia työn ongelmista ja jatkosta.

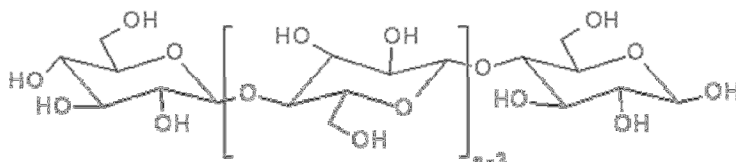
Sellunäytteiden värjäys jaettiin kolmeen erilliseen kokonaisuuteen, joissa tutkittiin erilaisia muuttujia. Ne olivat sellukonsentraatio, värin konsentraatio ja värjäysaika. Sellunäytteinä käytettiin mekaanisesti käsiteltyä ja käsittelemätöntä liukosellua. Ennakkoletuksena oli, että modifioidulla SS-menetelmällä saadaan selvä ero näytteiden välille, koska mekaanisen käsittelyn on osoitettu kasvattavan selluloosan alttiutta entsyymaattiselle pilkkoutumiselle.

## 2 TEORIA

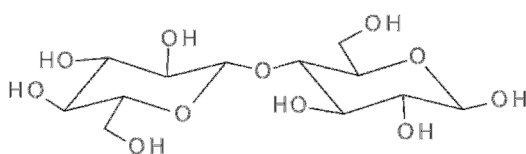
### 2.1 Selluloosa

Selluloosa on luonnossa esiintyvä polysakkaridi, jota on kaikissa kasveissa, mutta eniten puissa (noin 40 %). Se on kasvisolujen soluseinän pääkomponentti muodostaen solulle rungon, johon muut soluseinän rakennusaineet ovat kiinnittyneet. Muita rakennusaineita ovat hemiselluloosa ja ligniini. (Isotalo 2004, 41; Sjöström 1989, 21, 55; Valste, Airamo, Holopainen, Koivisto, Suominen, Viitanen 2001, 32.)

Molekulaarisella tasolla selluloosa on lineaarinen syndiotaktinen homopolymeeri (kuva 1), joka koostuu  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-glykosidi-sidoksilla toisiinsa liittyvistä D-glukopyranoosiyksiköistä. Yleensä selluloosan perusyksikkönä käsitetään kuitenkin dimeeri, sellobioosi (kuva 2), jolloin selluloosa on sellobioosin isotaktinen polymeeri. (Klemm, Philipp, Heinze, Heinze & Wagenknecht 1998, 9.)



KUVA 1. Homopolymeeri selluloosan rakennekuva (Klemm ym. 1998, 11, muokattu)



KUVA 2. Sellobioosin rakennekuva (Klemm ym. 1998, 11, muokattu)

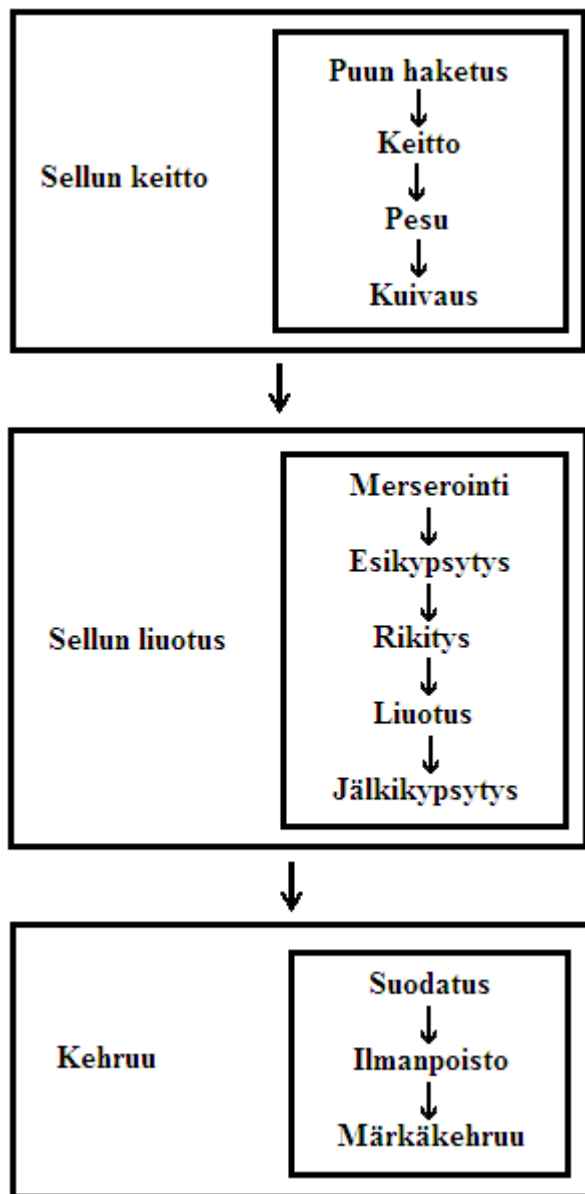
Tämän työn kannalta oleellinen asia on selluloosan huokosrakenne. Selluloosakuiduissa on monimutkainen huokosten, kapillaarien, tyhjiöiden ja rakojen järjestelmä, joiden koko ja muoto vaihtelevat huomattavasti. Huokoset ovat tärkeässä osassa selluloosan kemiallisissa reaktioissa, koska huokosten kautta kemikaalit ja entsyymit pääsevät sen sisään ja siksi huokoskokoa halutaan usein määrittää. (Klemm ym. 1998, 25.)

Selluloosasta voidaan valmistaa tekokuituja eli selluloosamuuntokuituja, jotka ovat kemialliselta rakenteeltaan lähes puhdasta selluloosaa, mutta eroavat luonnonkuiduista valmistusmenetelmässä ja raaka-aineessa. Luonnonkuitujen raaka-aineina ovat esimerkiksi puuvilla ja pellava, kun taas selluloosamuuntokuitujen raaka-aineena on puuraaka-aineesta erotettu selluloosa. Puuvilla ja pellava esiintyvät luonnossa kuitumaisina, mutta selluloosamuuntokuidut on saatettava kuitumuotoon kehruun avulla. (Boncamper 2004, 18, 212, 216.)

Selluloosamuuntokuidut ovat tekokuituja, koska ne eivät esiinny luonnossa kuitumuodossa vaikka niiden molekyylit ovat luonnosta peräisin. Selluloosamuuntokuituja ei pidä sekoittaa synteettisten kuitujen kanssa, koska ne ovat kaksi aivan eri asiaa. Selluloosamuuntokuitujen molekyylit ovat luonnollista selluloosaa ja synteettisten kuitujen molekyylit valmistetaan teollisesti öljystä ja kivihiilestä. (Boncamper 2004, 212, 254.)

Selluloosamuuntokuituja ovat esimerkiksi modaali ja lyocell, mutta kaikkein yleisin on viskoosi, jonka valmistusmenetelmä on esitetty kuviossa 1. Kuvio on piirretty Klemmin, Philipin, Heinzen, Heinzen ja Wagenknechtin (1998, 1–2) sekä Boncamperin (2004, 216–218) mukaan.





KUVIO 1. Viskoosin valmistus

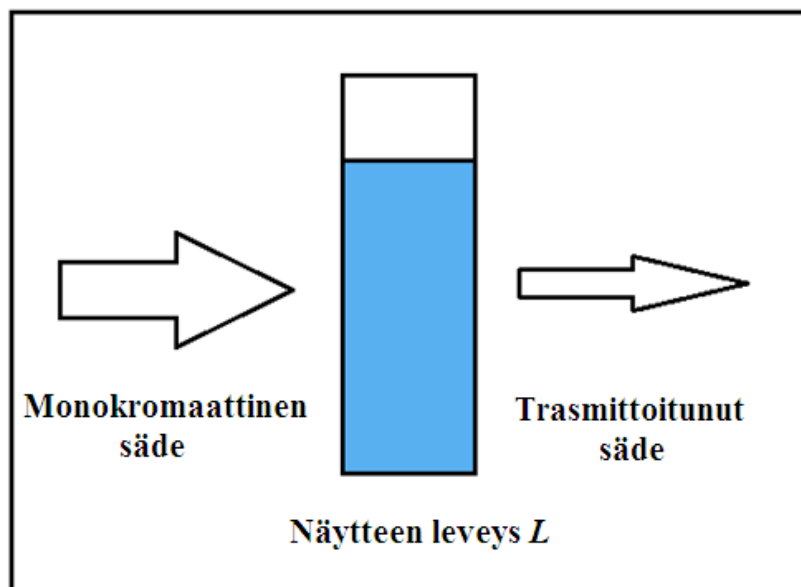
Kuviosta 1 nähdään, että viskoosin valmistus aloitetaan sellun keitolla, jolla erotetaan selluloosa puusta. Seuraavaksi saatu sellumassa liuotetaan kehrättävään muotoon. Ennen varsinaista liuotusta, sellumassa rikitetään eli lisätään rikkihiiltä ( $\text{CS}_2$ ), jolloin syntyy selluloosaksantaattia. Kun tämän liuottaa laimeaan natriumhydroksidi-liuokseen, syntyy oranssinkeltainen liuos eli viskoosi, joka kehrätään jälkikypsytyksen, suodattamisen ja ilmanpoiston jälkeen. (Klemm ym. 1998, 1–2; Boncamper 2004, 216–218)

Viskoosi kehrätään märkäkehrumenetelmällä, jossa se pumpataan tasaisella nopeudella kehrusuulakkeiden läpi kehruukylpyyn. Kehruukylpyliuos sisältää vettä, rikkihappoa ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), natriumsulfaattia ( $\text{NaSO}_4$ ) ja sinkkisulfaattia ( $\text{ZnSO}_4$ ). Kun viskoosiliuos kohtaa kehruukylvyn, se hyytyy ja syntyy kuitu. (Boncamper 2004, 219.)

Viskoosin valmistuksen negatiivinen puoli on se, että valmistuksessa käytetään erittäin myrkyllistä rikkihiiltä ja prosessissa syntyy rikkivetyä ( $H_2S$ ). Siksi korvaavaa ympäristöystävällisempää selluloosan liuotusmenetelmää kehitetään. Yhtenä vaihtoehtona rikkihiilen korvaajaksi ovat sellulaasi-entsyymit. Entsyymikäsitelty selluloosa liukenee suoraan alkaliseen liuokseen eli natriumhydroksidiin ja sinkkioksidiin ( $ZnO$ ). (Vehviläinen, Kamppuri, Rom, Janicki, Ciechańska, Grönqvist, Siika-Aho, Elg Christoffersson & Nousiainen 2008, 671)

## 2.2 UV-Vis-spektrofotometria

UV-Vis-spektrofotometrian avulla mitataan näytteen konsentraatio UV-valoa tai näkyvää valoa käyttäen (Harris 1999, 511). Menetelmä perustuu siihen, että erilaiset aineet absorboivat valoa eri aallonpituuksilla. Kuvassa 3 on esitetty UV-Vis-spektrofotometrian periaate. Kuvasta nähdään, että monokromaattorinen säde tulee näytteeseen ja siitä lähtevä transmittoitunut säde on pienempi, koska näyte on absorboinut valoa.



KUVA 3. UV-Vis-spektrofotometrian periaate (Hitachi 2011, Appendix-4, muokattu)

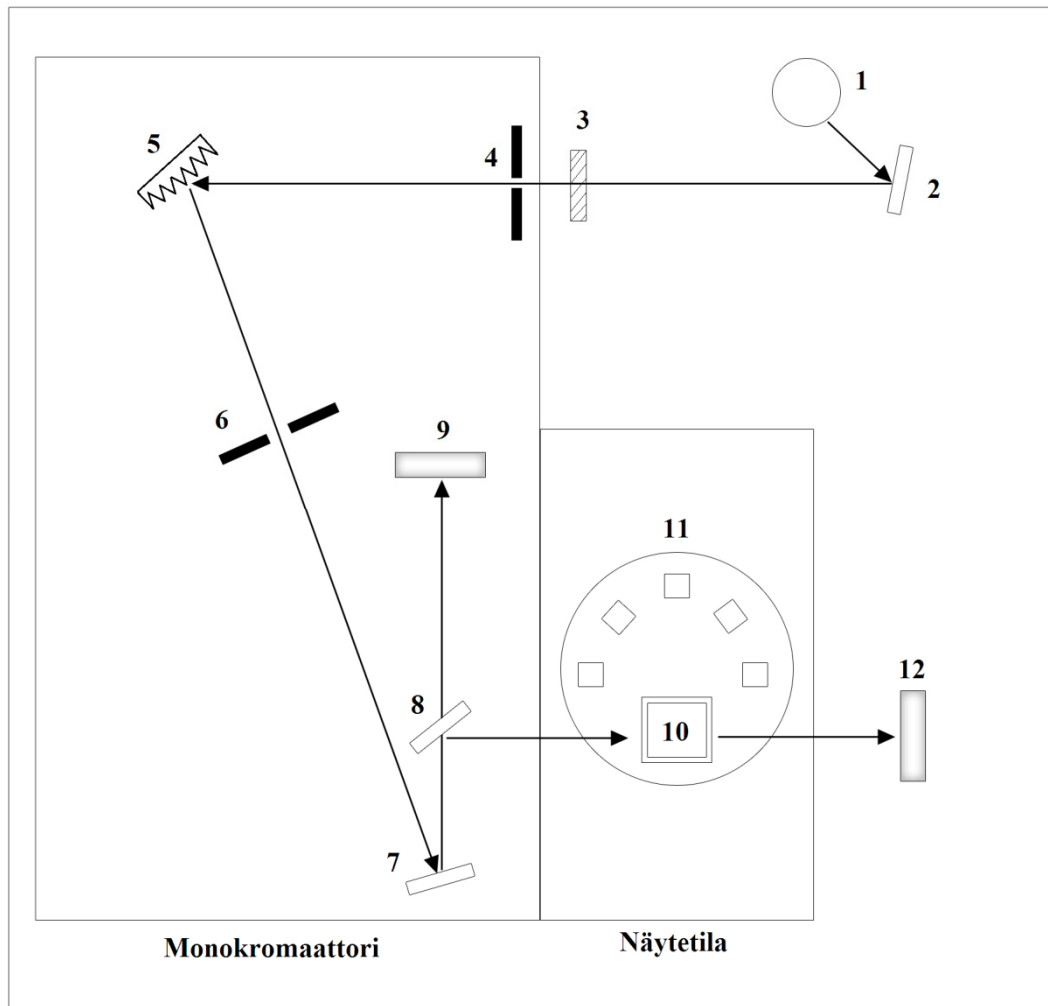
UV-Vis-spektrofotometrin avulla saadaan näytteestä mitattua transmittanssi ja absorptanssi. Transmittanssilla ( $T$ ) tarkoitetaan näytteen läpi päässeän valon määrää ja se ilmoitetaan yleensä prosentteina. Kun transmittanssista otetaan negatiivinen logaritmi,

saadaan absorbanssi ( $A$ ). Absorbanssista on johdettu Lambert-Beerin laki, jonka avulla näytteen konsentraatio lasketaan. (Harris 1999, 514.) Lambert-Beerin laista kerrotaan enemmän kappaleessa 2.3.

Työssä käytetty laite oli Hitachi U-5100 (kuva 4). Kyseessä oli suhdemittausta käyttävä UV-Vis-spektrofotometri. Valonlähteenä laitteessa oli vain mitattaessa päällä oleva ksenon-valo. Laitteen rakenne on kuvassa 5.



KUVA 4. Käytetty Hitachi U-5100 UV-Vis-spektrofotometri (Kuva: Susanna Salonen 2012)



KUVA 5. Hitachi U-5100 UV-Vis-spektrofotometrin optiikka (Hitachi 2011, Appendix-2, muokattu)

Kuvassa 5 on suhdemittausta käyttävän UV-Vis-spektrofotometrin toimintaperiaate. Valonsäde siirtyy valonlähteestä (1) suodattimen (3) kautta monokromaattoriin. Monokromaattorissa on hila (5), joka hajottaa säteilyn eri aallonpituuksiksi. Hilan asennon perusteella tietty aallonpituus menee läpi ulostuloraosta (6). Ulostuloraon jälkeen säde kohtaa peilin (7), joka heijastaa valon puolipeiliin (8). Puolipeili hajottaa säteily kahdeksi säteeksi, referenssisäteeksi ja näytesäteeksi. Referenssisäde menee monitoridetektoriin (9). Näytesäde kulkeutuu ulos monokromaattorista näytteen (10) läpi näytedetektoriin (12). (Hitachi 2011, Appendix-1.)

Suhdemittaus UV-Vis-spektrofotometri on yksisädelaitteen ja kaksisädelaitteen välimuoto. Yksisädelaitteissa käytetään vain yhtä sädettä, jolloin näyte ja referenssi on asetettava säteeseen vuorotellen. Kaksisädelaitteissa säde jaetaan säteenjakajalla, jolloin säde menee vuorotellen näytteen ja referenssin läpi. (Harris 1999, 518–519.) Suhdemit-

tausta käytävässä laitteessa säde jaetaan, mutta referenssisäde ei kulje referenssinäytteen vaan monitoridetektoriin. Monitoridetektori kompensoi valonlähteessä tapahtuvia energian muutoksia. Tämän ansiosta laitteen taustaviiva on tasaisempi kuin esimerkiksi yksisädelaitteissa. (Hitachi 2012)

### 2.3 Lambert-Beerin laki

Spektrofotometria perustuu Lambert-Beerin lakiin, joka yleensä kirjoitetaan muodossa:

$$A = \epsilon bc$$

jossa  $A$  = absorbanssi

$\epsilon$  = molaarinen absorptiokerroin ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

$b$  = säteilyn kulkema matka (cm)

$c$  = konsentraatio (M)

Työssä käytetään Lambert-Beerin lakia kaksikomponenttiliuoksille:

$$A_B = \epsilon_{O/B} \cdot L \cdot c_O + \epsilon_{B/B} \cdot L \cdot c_B \quad (1)$$

$$A_O = \epsilon_{O/O} \cdot L \cdot c_O + \epsilon_{B/O} \cdot L \cdot c_B \quad (2)$$

jossa  $A_O$  = absorbanssi oranssin värin maksimiaallonpituudella (414 nm)

$A_B$  = absorbanssi sinisen värin maksimiaallonpituudella (598 nm)

$\epsilon_{O/O}$  = oranssin standardisuoran kulmakerroin

$\epsilon_{B/B}$  = sinisen standardisuoran kulmakerroin

$\epsilon_{O/B}$  = sinisen maksimiaallonpituudella (598 nm) mitatun oranssin standardisuoran kulmakerroin

$\epsilon_{B/O}$  = oranssin maksimiaallonpituudella (414 nm) mitatun sinisen standardisuoran kulmakerroin

$L$  = säteilyn kulkema matka eli kyvetin leveys (1cm)

$c_O$  = oranssin värin konsentraatiota (mg/ml)

$c_B$  = sinisen värin konsentraatiota (mg/ml)

Kaavoissa otetaan huomioon toisen värin vaikutus mitatulla aallonpituudella, jolloin suljetaan pois värien mahdollinen häirintä. Kaavat ratkaistiin konsentraation  $c$  suhteen.

Sinisen värin konsentraatio saadaan ratkaisemalla kaava 1  $c_B$ :n suhteen.

$$c_B = \frac{A_{598nm} - \epsilon_{O/598nm} \cdot L \cdot c_O}{\epsilon_{B/598nm} \cdot L} \quad (3)$$

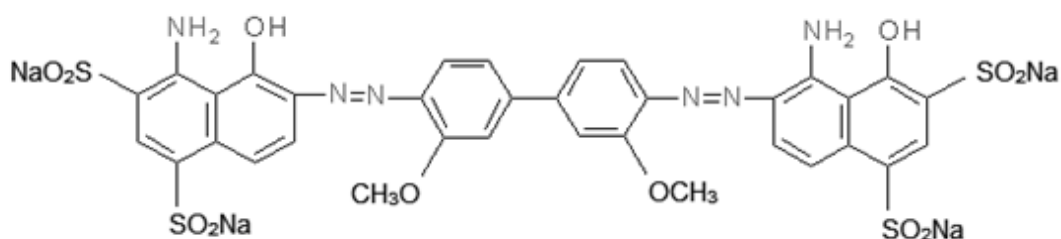
Oranssin värin konsentraatio saadaan ratkaisemalla kaava 2  $c_O$ :n suhteen.  $c_B$ :ksi sijoitetaan kaava 3.

$$c_O = \frac{A_{414nm} \cdot \epsilon_{B/598nm} - \epsilon_{B/414nm} \cdot A_{598nm}}{L(\epsilon_{O/414nm} \cdot \epsilon_{B/598nm} - \epsilon_{B/414nm} \cdot \epsilon_{O/598nm})} \quad (4)$$

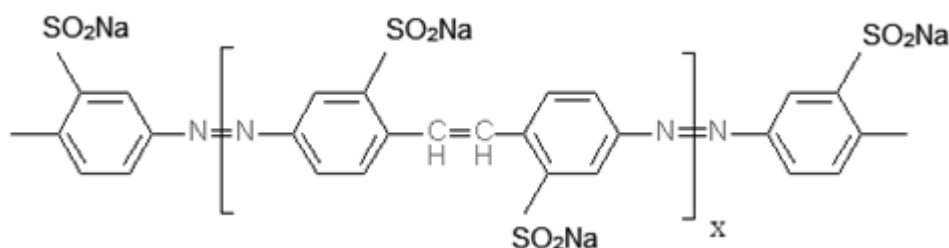
## 2.4 Simons' Staining-menetelmä

Simons' Staining(SS)-menetelmä kehitettiin paperimassan fysikaalisten ominaisuuksien tutkimiseen mikroskoopilla (Yu & Atalla 1998, 135). Menetelmä on erittäin hidas ja subjektiivinen, joten sitä kehitettiin objektiivisemmaksi, jolloin syntyi perinteinen UV-Vis-spektrofotometriä käyttävä SS-menetelmä. Siitä kehitettiin modifioitu SS-menetelmä, jota käsitellään tässä työssä (Chadra, Ewanick, Hsieh & Saddler 2008, 1178).

Menetelmä perustuu kahden värin, oranssin ja sinisen, erilaisiin ominaisuuksiin. Värien molekyyliarakenteet ovat kuvissa 6 ja 7. Oranssin värin molekyylit ovat isoja ja niillä on suuri affiniteetti selluun, kun taas sinisen värin molekyylit ovat pieniä ja niiden affiniteetti on pienempi kuin oranssin. (Yu & Atalla 1998, 136.)



KUVA 6. Sinisen värimolekyylin (Direct Blue 1) kemiallinen rakenne (Yu & Atalla 1998, 135, muokattu)



KUVA 7. Oranssin värimolekyylin (Direct Orange 15) kemiallinen rakenne (Yu & Atalla 1998, 135, muokattu)

Kuvasta 6 havaitaan, että sinisen värin rakenne on selkeä ja sen kemiallinen rakenne on määritetty tarkasti, kun taas oranssi väri (kuva 7) on polymeeri (Yu & Atalla 1998, 135.) Yun ja Atallan (1998, 135) mittauksien mukaan oranssin värimolekyylin halkaisija on noin 5 – 36 nm, kun taas sinisen värimolekyylin halkaisija on 1 nm.

Kun selluloosaa värjätään oranssin ja sinisen värin seoksella, ensisijaisesti oranssi väri adsorboituu kuidun pintaan, mutta se pääsee adsorboitumaan vain, jos huokonen on tarpeeksi suuri. Jos huokokset ovat pieniä, heikomman affiniteetin omaava sininen väri adsorboituu kuidun pintaan. Huokoskoon voi siis päätellä sen mukaan kumpaa väriä adsorboituu enemmän: jos kuituun adsorboituu enemmän oranssia väriä, huokokset ovat isoja ja jos sinistä väriä adsorboituu enemmän, huokokset ovat pieniä. (Yu & Atalla 1998, 135.)

Perinteisessä, UV-Vis-spektrofotometriä käyttävässä, SS-menetelmässä kuidut värjätään ja ne erotetaan värjäysliuoksesta suodattamalla. Kuituihin adsorboitunut väri liuotetaan 25 % pyridiiniin ja siitä mitataan absorbanssit UV-Vis-spektrofotometrillä värien absorptiomaksimeilla. (Yu & Atalla 1998, 137.) Modifioidussa SS-menetelmässä kuidut värjätään PBS-puskuria sisältävässä värjäysliuoksessa ja koko värjätty näyte sentrifu-

goidaan. Supernatantista eli nestefaasista otetaan näyte ja se mitataan UV-Vis-spektrofotometrillä molempien värien absorptiomaksimeilla. (Chandra ym. 2008, 1180.) Molemmissa menetelmissä värien konsentraatiot lasketaan Lambert-Beerin lain avulla (Yu & Atalla 1998, 137; Chandra ym. 2008, 1180). Modifioitu SS-menetelmä on kehitetty näytteenkäsittelyn nopeuttamiseksi ja samalla pyridiiniä ei enää tarvita, koska adsorboitunutta väriä ei liuoteta.

Koska oranssi väriliuos sisältää erikokoisia värimolekyylejä, se on fraktioitava ennen käyttöä. Vain suurimmat molekyylit käytetään analyysin niiden suuren molekyylikoon vuoksi ja siksi, että vain niillä on suurempi affiniteetti selluun kuin sinisillä molekyyleillä. Fraktiointi suoritettiin suodattamalla 1 % (w/v) oranssia väriliuosta ultrasuodatusmembraanin läpi, kunnes 20 % alkuperäisestä tilavuudesta oli jäljellä. (Chandra ym. 2008, 1179 - 1180.)



### 3 KOKEELLINEN OSUUS

#### 3.1 Materiaalit

##### 3.1.1 Sellut

Sellunäytteenä käytettiin Domsjö Fabrikerin valmistamaa havupuuliukosellua, josta tehtiin kaksi varsinaista näytettä, käsittelemätön ja mekaanisesti käsitelty (kuva 8). Ne valmistettiin kuivista arkeista, jotka vesiaktivoitiin. Siinä kuiva sellu lietetään veteen ilman kuitujen rakenteeseen vaikuttavaa mekaanista voimaa. Vesiaktivointi suoritettiin punnitsemalla sellua sen verran, että kuiva-ainetta oli 100 g ja siihen lisättiin 1900 ml ionivaihdettua vettä. Seosta sekoitettiin potkurisekoittaja, kunnes massa oli homogeenistä ja sen annettiin tasaantua seuraavaan päivään, jonka jälkeen seos suodatettiin. Käsittelemättömälle sellulle tehtiin vain vesiaktivointi, mutta mekaanisesti käsitelty sellu käsiteltiin Baker Perkins-jauhimella viiden tunnin ajan.



KUVA 8. Työssä käytetyt sellunäytteet, vasemmalla käsittelemätön ja oikealla mekaanisesti käsitelty sellu. (Kuva: Susanna Salonen 2012)

Käsittelemättömässä sellussa on isoja paakkuja ja kuidut ovat pitkiä ja mekaanisesti käsitellyssä sellussa on pieniä rakeita ja kuidut ovat lyhyitä (kuva 8).

### 3.1.2 Värät

Väreinä käytettiin Pylam Productin sinistä väriä Pontamine Sky Blue 6BX ja oranssia väriä Pontamine Fast Orange 6RN. Värien luokat olivat Direct Blue 1 ja Direct Orange 15.

### 3.1.3 PBS-puskuri

PBS-puskurin valmistukseen käytettiin 1 M natriumdivetyfosfaatti-liuosta ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), 0,4 M natriummonovetyfosfaatti-liuosta ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) ja 5 M natriumkloridi-liuosta ( $\text{NaCl}$ ). PBS-puskurin valmistusohje on liitteessä 1. Varastoliuokset valmistettiin Baker analyzed-laatusista natriumdivetyfosfaatti monohydraatista ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), natriummonovetyfosfaatti dihydraatista ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ) ja natriumkloridista ( $\text{NaCl}$ ).

### 3.1.4 Pyridiini

Työtä varten tarvittiin 25 % pyridiiniliuos. Käytettävissä oli 99,5 % pyridiiniä (Pro Analysis-laatu), joten kyseistä liuosta laimennettiin suhteessa 1:4. Käytännössä 99,5 % pyridiiniä pipetoitiin 12,5 ml 50 ml mittapulloon ja mittapullo täytettiin merkkiin ionivaihdetulla vedellä.

Pyridiinin ( $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$ ) käyttöturvallisuustiedotteen mukaan se on helposti syttyvää ja haitallista terveydelle hengitettynä, nieltynä ja joutuessaan iholle. Pyridiiniä käsiteltäessä on siis suojauduttava asianmukaisesti suojalaseilla ja suojakäsineillä sekä mahdollisesti hengityssuojaimilla. Pyridiini on myrkyllistä vesieliöille, joten sitä ei saa päästää juoma- tai jäteveteen eikä maahan ja se on ongelmajätettä.

## 3.2 Menetelmät

### 3.2.1 Väriliuosten valmistus

Molemmista väreistä valmistettiin varastoliuokset, joiden pitoisuus oli 10 mg/ml. Sininen väriliuos valmistettiin punnitsemalla 1,0 g sinistä väriä, joka liuotettiin 100 ml ioni-vaihdettua vettä. Oranssi väriliuos tuli fraktioida ennen käyttöä ja se tehtiin Chandran, Ewanickin, Hsiehin ja Saddlerin (2008, 1179–1180) ohjeen mukaan. Väristä valmistettiin 1 % (w/v) liuos, jota suodatettiin ultrasuodatusmembralla (100K), niin kauan kunnes alkuperäisestä tilavuudesta oli 20 % jäljellä. Jäljelle jäänyt liuos otettiin talteen ja loput 80 % hylättiin. Suodatus suoritettiin sentrifugilla.

Molemmista väreistä määritettiin tarkka pitoisuus. Määritys tehtiin Esteghlalianin, Bilodeaun, Mansfieldin ja Saddlerin (2001, 1050) menetelmällä kuivaamalla tunnettu tilavuus (1 ml) väriä punnitusastiassa (kuva 9) 50 °C uunissa viisi vuorokautta. Kiinteä jäännös punnittiin, jolloin saatiin väriliuoksen pitoisuus mg/ml. Määrityksessä tehtiin kolme rinnakkaista näytettä.



KUVA 9. Punnitusastia, jossa on kuivattu sininen väriliuos (Kuva: Susanna Salonen 2012)

### 3.2.2 Väriliuosten spektrit

Värien absorptiomaksimien määrittämiseksi, niistä tehtiin spektrit UV-Vis-spektrofotometrillä. Spektrit tehtiin vesiliuoksille sekä PBS-puskuria ja pyridiiniä sisältäville liuoksille.

PBS-puskurin vaikutus väriliuosten absorptiomaksimeihin haluttiin tietää, koska Chandra, Ewanick, Hsieh ja Saddler (2008, 1180) käyttivät sitä modifioidun SS-tekniikan värjäyksessä. Sen pH oli 6 ja sisälsi 0,3 M fosfaattia ( $\text{PO}_4^{-3}$ ) ja 1,4 mM natriumkloridia (NaCl).

Pyridiinin vaikutus absorptiomaksimeihin haluttiin tietää, koska perinteisessä SS-menetelmässä Yu ja Atalla (1998, 137) käyttivät 25 % pyridiiniliuosta adsorboituneen värin irrottamiseen kuiduista, jonka jälkeen värillinen liuos mitattiin UV-Vis-spektrofotometrillä. Modifioidussa SS-menetelmässä Chandra, Ewanick, Hsieh ja Saddler (2008, 1180) eivät käyttäneet pyridiiniä, mutta mittasivat pyridiiniä sisältävät ja sisältämättömät näytteet samoilla aallonpituuksilla.

Työ aloitettiin valmistamalla mitattavat liuokset, jonka jälkeen kaikista liuoksista tehtiin 1:10 laimennos. Laimennetuista väriliuoksista ajettiin spektrit aallonpituusalueella 400 – 800 nm. Skannausnopeutena käytettiin 400 nm/min.

Veteen tehtiin yksittäiset väriliuokset molemmille väreille sekä 1:1 seos. Yksittäiset väriliuokset valmistettiin seuraavasti:

0,25 ml väriliuosta, jonka pitoisuus 10 mg/ml  
9,75 ml ionivaihdettua vettä

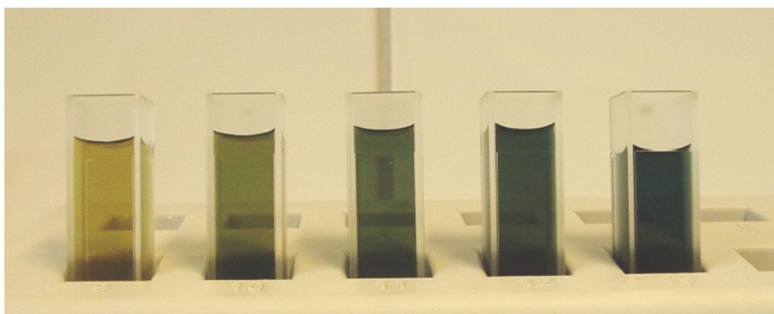
Liuokset sisältävät 0,25 mg/ml väriä.

1:1 seos valmistettiin:

0,25 ml oranssia väriä, jonka pitoisuus 10 mg/ml  
0,25 ml sinistä väriä, jonka pitoisuus 10 mg/ml  
9,5 ml ionivaihdettua vettä

Liuos sisältää molempia värejä 0,25 mg/ml.

PBS-puskurin kanssa tehtiin väriliuokset oranssista ja sinisestä väristä, sekä värien 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 ja 1:5 seosliuokset. Liuosten reseptit ovat liitteessä 2. Yksittäisien värien pitoisuus oli 0,25 mg/ml, väriseosten pitoisuus on liitteessä 2. Laimennetut seokset ovat kuvassa 10. Yksittäiset värit ja 1:1 seoksen spektri ajettiin vettä ja PBS-puskuria vasten, koska haluttiin tietää, voiko nollana olla vesi vaikka liuos sisältää PBS-puskuria. Muut seokset ajettiin vain vettä vasten.



KUVA 10. Oranssin ja sinisen värin seokset, vasemmalta oikealle: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 ja 1:5 (Kuva: Susanna Salonen 2012)

Väriliuoksista tutkittiin myös laimentamisen vaikutusta absorptiomaksimiin. Mittaukseen käytettiin liuoksista tehtyjä standardisuoria, joiden reseptit ja pitoisuudet kerrotaan kappaleessa 3.2.3.

Pyridiiniä sisältäviä näytteitä tehtiin kaksi, oranssi ja sininen, jotka valmistettiin seuraavasti:

Oranssi liuos:

0,025 ml oranssia väriä, jonka pitoisuus oli 10 mg/ml

9,975 ml 25 % pyridiiniä

Sininen liuos:

0,125 ml sinistä väriä, jonka pitoisuus oli 10 mg/ml

9,875 ml 25 % pyridiiniä

Oranssin liuoksen väripitoisuus oli 0,025 mg/ml ja sinisen 0,125 mg/ml. Liuoksista ajettiin spektrit ja spektrejä verrattiin samanpitoisiin PBS-puskuria sisältävien liuosten spektreihin.

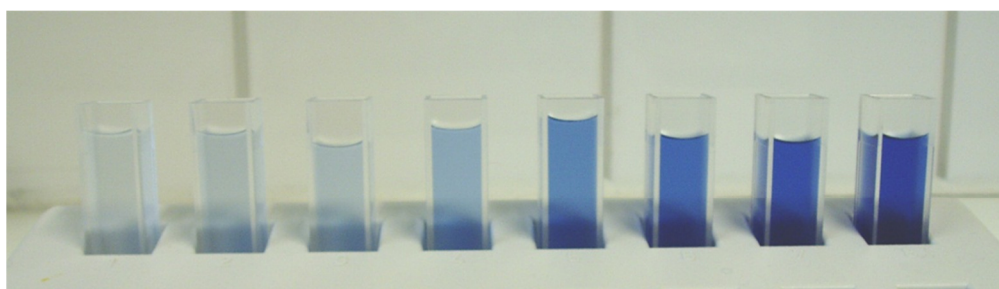
### 3.2.3 Standardisuorat

Perusliuoksista tehtiin molemmille väreille kaksi erilaista standardisuoraa. Aallonpituuksina käytettiin värien absorptiomaksimeja 414 nm ja 598 nm. Varsinaisessa standardisuorassa standardit mitattiin absorptiomaksimissaan ja toisissa standardeissa sinisen värin absorptio mitattiin oranssin maksimiaallonpituudella ja oranssin värin absorptio sinisen maksimiaallonpituudella. Näiden liuosten tuli olla väkeviä, jotta saatiin tarpeeksi suuret absorbanssit.

Standardisuora siniselle värille valmistettiin laimentamalla PBS-väriliuosta, jonka pitoisuus oli 0,25 mg/ml. Standardeja tehtiin useita, joista valittiin sopivat pitoisuudet. Oranssin aallonpituudella mitattava standardisuora tehtiin sinisen varastoliuoksesta, jonka pitoisuus oli 10 mg/ml. Varsinaisen standardien pitoisuudet ja PBS-väriliuoksen määrät ovat taulukossa 1 ja väkevän standardisuoran taulukossa 2. Molempien standardien lopullinen tilavuus oli 10 ml. Mitatut standardisuorat ovat kuvissa 11 ja 12.

TAULUKKO 1. Sinisen standardisuoran pitoisuudet ja väriliuoksen (0,25 mg/ml) määrät

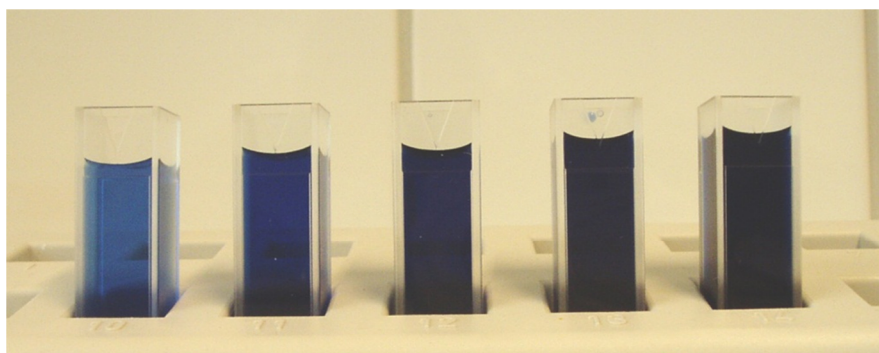
Pitoisuus (mg/ml)	Sininen PBS-väriliuos (ml)	Vesi (ml)
0,005	0,2	9,8
0,010	0,4	9,6
0,0125	0,5	9,5
0,025	1	9,0
0,050	2	8,0
0,075	3	7,0
0,100	4	6,0
0,125	5	5,0



KUVA 11. Sininen standardisuora, pitoisuus kasvaa vasemmalta oikealle (Kuva: Susanna Salonen 2012)

TAULUKKO 2. Oranssin maksimiaallonpituudella 414 nm mitatun sinisen standardisuoran pitoisuudet ja väriliuoksen (10 mg/ml) määrät

Pitoisuus (mg/ml)	Sininen PBS-väriliuos (ml)	Vesi (ml)
0,1	0,1	9,9
0,2	0,2	9,8
0,3	0,3	9,7
0,4	0,4	9,6
0,5	0,5	9,5



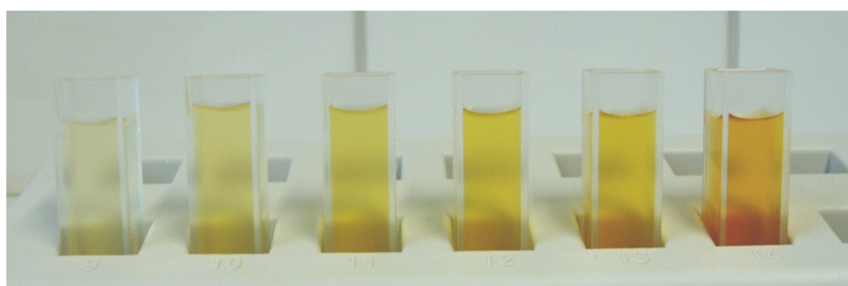
KUVA 12. Oranssin aallonpituudella 414 nm mitatut siniset standardit, pitoisuus kasvaa vasemmalta oikealle (Kuva: Susanna Salonen 2012)

Oranssin värin varsinainen standardisuora valmistettiin kuten sininen standardisuora. Standardisuora sinisen aallonpituudella mitattavalle oranssille valmistettiin muuten kuin sininen standardisuora, mutta lopullinen tilavuus oli 5 ml. Taulukkoon 3 ja 4 on koottu standardien pitoisuudet ja väriliuoksen määrät ja valmiit standardisuorat ovat kuvissa 13 ja 14.



TAULUKKO 3. Oranssin standardisuoran pitoisuudet ja väriliuoksen (0,25 mg/ml) määrät

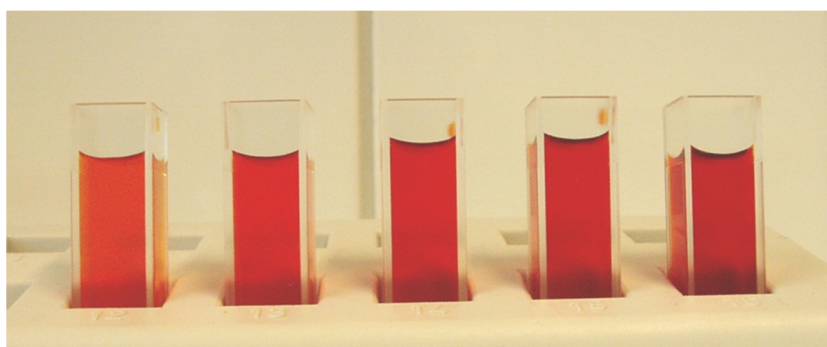
Pitoisuus (mg/ml)	Oranssi PBS-väriliuos (ml)	Vesi (ml)
0,005	0,2	9,8
0,010	0,4	9,6
0,015	0,6	9,4
0,020	0,8	9,2
0,025	1	9,0
0,050	2	8,0



KUVA 13. Oranssi standardisuora, pitoisuus kasvaa vasemmalta oikealle (Kuva: Susanna Salonen 2012)

TAULUKKO 4. Sinisen maksimiaallonpituudella 598 nm mitatun oranssin standardisuoran pitoisuudet ja väriliuoksen (10 mg/ml) määrät

Pitoisuus (mg/ml)	Oranssi PBS-väriliuos (ml)	Vesi (ml)
0,2	0,1	4,9
0,4	0,2	4,8
0,6	0,3	4,7
0,8	0,4	4,6
1,0	0,5	4,5



KUVA 14. Sinisen aallonpituudella 598 nm mitatut oranssit standardit, pitoisuus kasvaa vasemmalta oikealle (Kuva: Susanna Salonen 2012)



### 3.2.4 Sellujen kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen

Kuiva-ainepitoisuus (kap%) määritettiin punnitsemalla sellua taarattuun astiaan ja kuivaamalla näyte 105 °C uunissa yön yli. Kuiva-ainepitoisuus määritettiin käsittelemättömälle sellulle (N) ja mekaanisesti käsitellylle sellulle (M). Molemmista näytteistä tehtiin kolme rinnakkaista määrittystä. Kuiva-ainepitoisuus laskettiin kaavalla 5 ja saadut tulokset on liitteessä 3.

$$\frac{(\text{Astia} + \text{Kuivattu näyte} - \text{Astia})}{\text{Märkä näyte}} \cdot 100\% \quad (5)$$

### 3.2.5 Sellunäytteiden värjäys

Sellunäytteiden värjäyksen tarkoituksena on määrittää selluun adsorboituneen värin kokonaismäärä ja adsorboituneen oranssin ja sinisen värin suhde. Ennen värjäystä on määritettävä sellunäytteiden kuiva-ainepitoisuus. Sitä tarvitaan näytteen määrän laskemiseen, jotta oikea määrä sellua värjätään.

Työn tarkoituksena oli löytää sopivimmat värjäysolosuhteet eli sellun määrä, värien määrät ja värjäysaika. Työtä varten tehtiin useita erilaisia testivärjäyksiä, joissa eri parametreja muutettiin, kunnes sopivat löydettiin.

Kaikki värjäykset tehtiin samalla prosessilla:

1. Sellunäytteen punnitseminen koeputkeen.
2. Reagenssien pipetoiminen koeputkeen.
3. Näytteiden värjäys 70 °C vesihauderavistelijassa (kuva 15) määrätty aika.
4. Näytteiden sentrifugointi viisi minuuttia.
5. Näytteen supernatantin laimennus.
6. Laimennetun näytteen mittaus UV-Vis-spektrofotometrillä aallonpituuksilla 414 nm ja 598 nm.
7. Tulosten laskeminen



KUVA 15. Värjättävät näytteet vesihauderavistelijassa (Kuva: Susanna Salonen 2012)

Kaikissa värjäyksissä käytettiin 1:4 väriseosta (oranssi/sininen). Liuos valmistettiin punnitsemalla 49,16 g sinistä varastoliuosta (10 mg/ml), 12,63 g oranssia varastoliuosta (10 mg/ml) ja 38,21 g ionivaihdettua vettä. Liuksessa on sinistä väriä 5 mg/ml ja oranssia 1,25 mg/ml. Liuos tehtiin punnitsemalla, koska värien väkeviä varastoliuoksia oli hankala pipetoida. Pipetoitaessa väriliuosta jäi automaattipipetin kärkeen, joten tehdyn liuoksen pitoisuus ei ollut tarkka. Muut reagenssit olivat PBS-puskuri ja ionivaihdettu vesi.

### 3.2.5.1. Muuttujana sellukonsentraatio

Työssä testattiin kahta sellukonsentraatioita 1 wt% ja 0,2 wt%. Sellukonsentraatiossa 1 wt% 10 ml väriliuosta on 100 mg kuivaa näytettä ja sellukonsentraatiossa 0,2 wt% 10 ml väriliuosta on 20 mg kuivaa näytettä. Työssä käytettiin vain käsittelemätöntä sellua N, jota punnittiin tarkasti:

$$\frac{100 \text{ mg}}{0,294575} = 339,5 \text{ mg}$$

$$\frac{20 \text{ mg}}{0,294575} = 67,9 \text{ mg}$$

Näytteet käsiteltiin värjäysprosessin mukaisesti ja niitä värjättiin vesihauderavistelijassa kuusi tuntia, kuten Chandra, Ewanick, Hsieh ja Saddler (2008, 1183). Reagenssien määrä on esitetty liitteessä 4. Värjätyt näytteet laimennettiin 1:50.

### 3.2.5.2. Muuttujana värin konsentraatio

Työssä testattiin kahta eri värikonsentraatiota:

- Oranssille 0,284 mg/ml, ja 0,625 mg/ml
- Siniselle 1,136 mg/ml ja 2,5 mg/ml

Näytteet valmisteltiin värjäysprosessin mukaisesti ja sellukonsentraationa käytettiin 1 wt%:a. Käsittelemätöntä sellua (N) punnittiin 339,5 mg. Mekaanisesti käsitellyn sellun (M) määrä laskettiin kuten käsittelemättömän sellun, joten sitä punnittiin 379,3 mg.

Näytteitä värjättiin vesihauderavistelijassa kuusi tuntia. Reagenssien määrät ovat liitteessä 5. Pienimmän pitoisuuden näytteet laimennettiin 1:25 ja muut 1:50.

### 3.2.5.3. Muuttujana värjäysaika

Työssä testattiin kolmea lyhyempää värjäysaikaa, jotka olivat 0, 30 ja 60 minuuttia. Näytteet valmisteltiin värjäysprosessin mukaisesti ja sellukonsentraatio oli 1 wt%.

Reagenssien määrät on esitetty liitteessä 6. Värjäyksen jälkeen näytteet laimennettiin suhteessa 1:25.

### 3.3 Tulokset

#### 3.3.1 Väriliuosten pitoisuus

Aluksi väriliuosten pitoisuus määritettiin kuivaamalla 1 ml liuosta 50 °C uunissa viisi vuorokautta. Ongelmana määrittämisessä oli sen pitkä kesto ja tulosten suuri hajonta. Värien pitoisuus päätettiin siksi määrittää kuivaamalla tunnettu tilavuus (1 ml) väriä 105 °C uunissa noin neljä tuntia eli kunnes näyte oli kuiva. Myös rinnakkaisten näytteiden määrä nostettiin kuuteen. Kyseisellä menetelmällä saatiin samanlaisia tuloksia kuin Esteghlalianin, Bilodeaun, Mansfieldin ja Saddlerin (2001, 1050) menetelmällä.

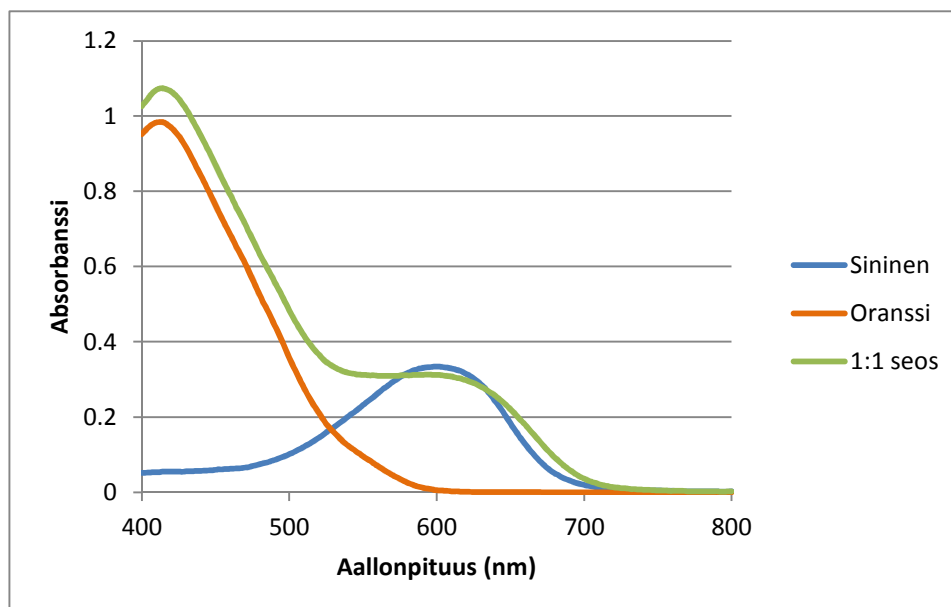
Taulukkoon 5 on laskettu käytettyjen värien pitoisuudet. Oranssin pitoisuus määritettiin pidemmällä menetelmällä ja sinisen nopealla menetelmällä. Siniselle tehtiin kuusi rinnakkaista näytettä, mutta yksi jouduttiin hylkäämään suuren poikkeaman vuoksi.

TAULUKKO 5. Käytettyjen väriliuosten pitoisuudet

Väriliuos	Rinnakkaisten näytteiden tulokset (mg/ml)	Keskiarvo (mg/ml)	Keskihajonta (mg/ml)
Sininen	10,11	10,17	0,1468
	10,03		
	10,34		
	10,05		
	10,32		
Oranssi	10,00	9,9	0,5568
	10,40		
	9,30		

### 3.3.2 Väriliuosten spektrit

Veteen tehtyjen väriliuosten tuloksista piirrettiin spektrit samaan kuvioon, joka on kuviona 2.



KUVIO 2. Spektrit veteen tehdyistä liuoksista

Kuviosta 2 nähdään, että sinisen ja oranssin absorptiomaksimit ovat erillään toisistaan. 1:1 seoksen spektrissä nähdään kaksi selkeää piikkiä, eli sinisen ja oranssin. Huomattavaa on myös, että seoksen oranssin piikin absorptanssi on suurempi kuin pelkän oranssin. Taulukkoon 6 on kerätty kaikkien spektrien absorptiomaksimit

TAULUKKO 6. Veteen tehtyjen liuosten absorptiomaksimit

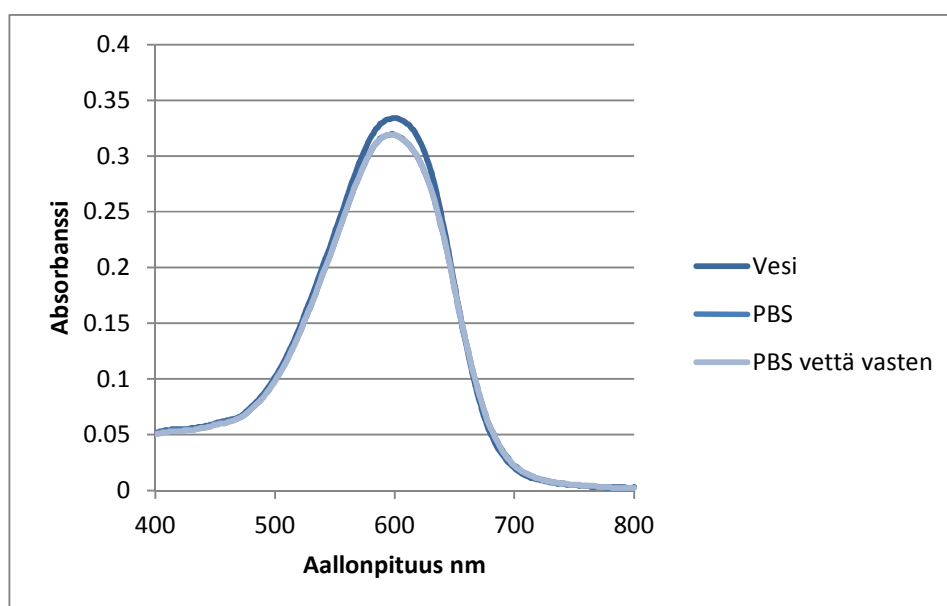
Näyte	Absorptiomaksimi (nm)
Sininen	600
Oranssi	412
1:1 seos, piikki 1	594
1:1 seos, piikki 2	414

Väriliuosten absorptiomaksimit poikkeavat huomattavasti kirjallisuuden arvoista (taulukko 7). Poikkeamiin voi olla useita syitä, kuten laite, värit ja muut reagenssit, joten seuraavaksi mitattiin PBS-puskurin ja pyridiinin vaikutus absorptiomaksimeihin.

TAULUKKO 7. Kirjallisuuden absorptiomaksimit ja mitatut absorptiomaksimit

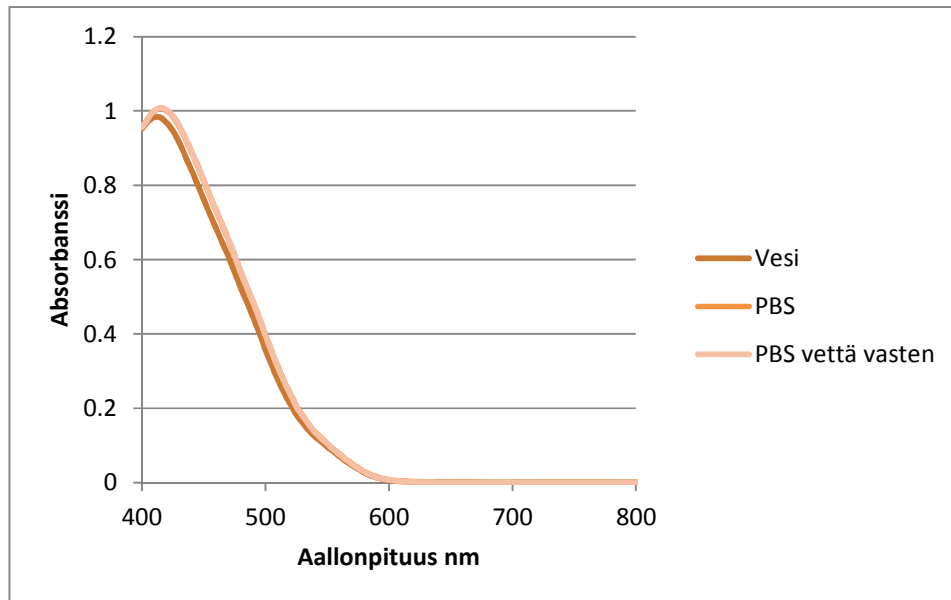
Mittaja	Maksimiaallonpituus, Sininen (nm)	Maksimiaallonpituus, Oranssi (nm)
Esteghlalian et al.	621,5	450,0
Chandra et al.	642,0	455,0
Salonen	600,0	412,0

PBS-puskuria sisältävien liuosten tuloksista piirrettiin spektrit ja kaikki kolme spektriä piirrettiin samaan kuvioon. Vesi tarkoittaa kokonaan veteen tehtyä liuosta, PBS tarkoittaa PBS-puskuria sisältävää väriliuosta, joka on mitattu käyttämällä PBS-puskuria sisältävää ionivaihdettua vettä nollanäytteenä ja PBS vettä vasten tarkoittaa PBS-puskuria sisältävää liuosta, joka mitattiin käyttämällä ionivaihdettua vettä nollanäytteenä. Piirretyt spektrit ovat kuvioissa 3 - 9.



KUVIO 3. Sinisten väriliuosten spektrit

Kuviosta 3 havaitaan, että sinisen veteen tehdyn liuoksen spektri on vain hieman erilainen kuin PBS-puskuria sisältävien liuosten. Kuviosta nähdään myös, ettei nollanäyte vaikuta PBS-puskuria sisältävien liuosten spektreihin. Sinisten väriliuosten absorptiomaksimit ovat taulukossa 8.

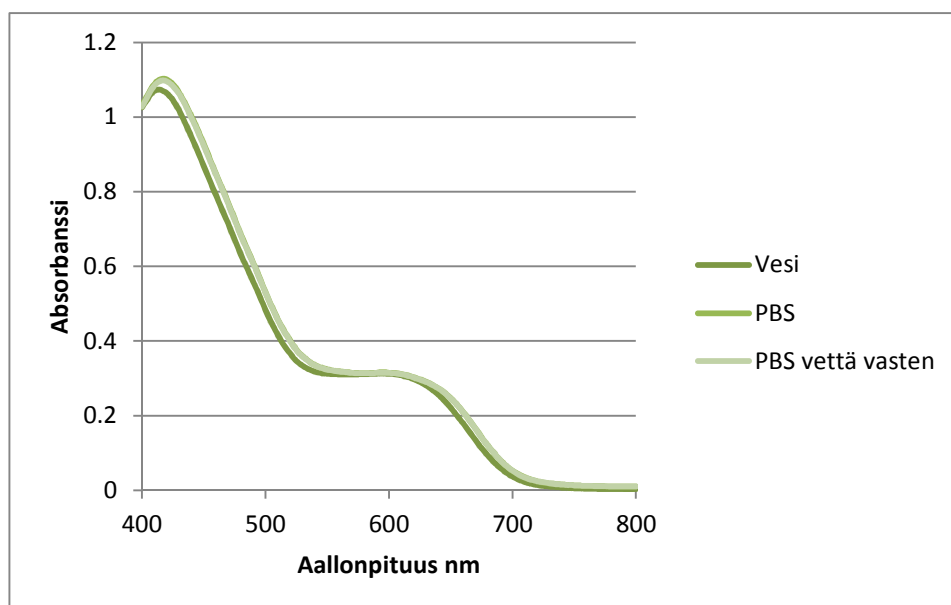


KUVIO 4. Oranssien väriliuosten spektrit

Kuviosta 4 voidaan nähdä, ettei PBS juurikaan vaikuta oranssien liuosten absorptiomaksimiin. Myöskään nollanäyte ei vaikuta absorptiomaksimiin. Oranssien väriliuosten spektrien absorptiomaksimit ovat taulukossa 8.

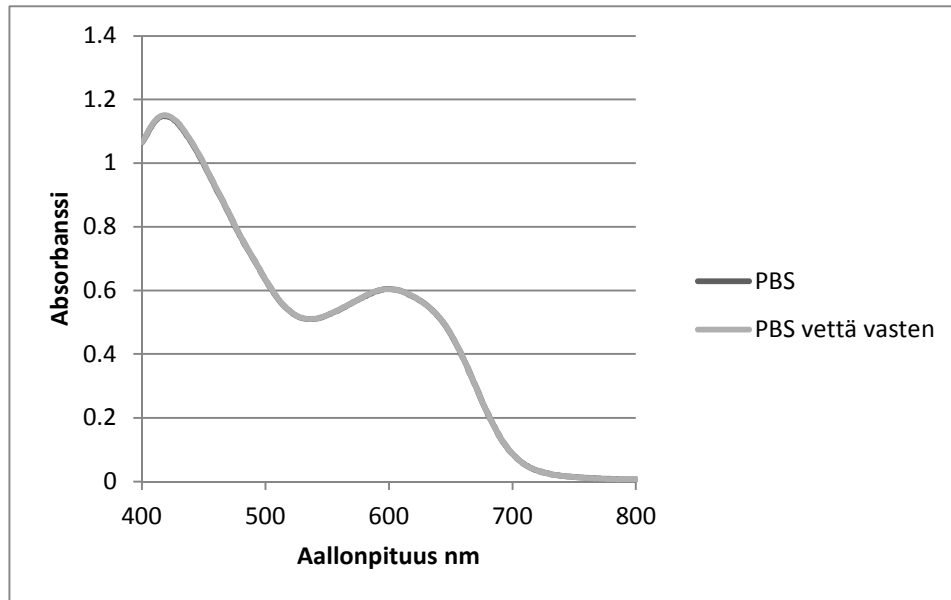
TAULUKKO 8. Sinisten ja oranssien väriliuosten absorptiomaksimit

	Vesi	PBS	PBS vettä vasten
Sininen	600 nm	598 nm	598 nm
Oranssi	412 nm	416 nm	414 nm



KUVIO 5. 1:1 seoksien spektrit

Kuviosta 5 huomataan sama kuin sinisen ja oranssin spektreistä, eli ettei PBS-puskuri vaikuta juurikaan 1:1 väriseoksen absorptiomaksimeihin. Spektrin absorptiomaksimit ovat taulukossa 9.



KUVIO 6. 1:2 seoksien spektrit

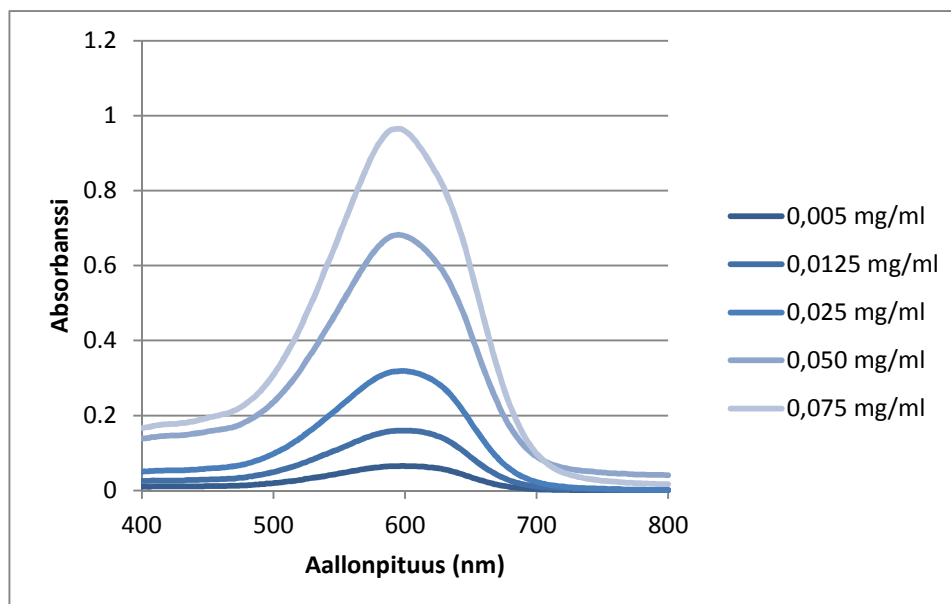
Kuviosta 6 havaitaan selvästi, että nollanäyte ei vaikuta spektriin, koska 1:2 seoksien spektrit ovat identtiset. 1:2 seoksesta ei tehty vesiliuosta. Spektrin absorptiomaksimit ovat taulukossa 9.

TAULUKKO 9. Oranssin ja sinisen väriseosten spektreistä löydettyjen piikkien absorptiomaksimit

Seos	Vesi	PBS	PBS vettä vasten
1:1	594 nm	594 nm	596 nm
1:1	414 nm	418 nm	418 nm
1:2	-	598 nm	598 nm
1:2	-	418 nm	418 nm

Kuvioissa 7 ja 8 on esitetty eripitoisten väriliuosten spektrit, jotka mitattiin standardiliuoksina. Kuviossa 7 ovat sinisen värin spektrit ja kuviossa 8 oranssin värin spektrit.



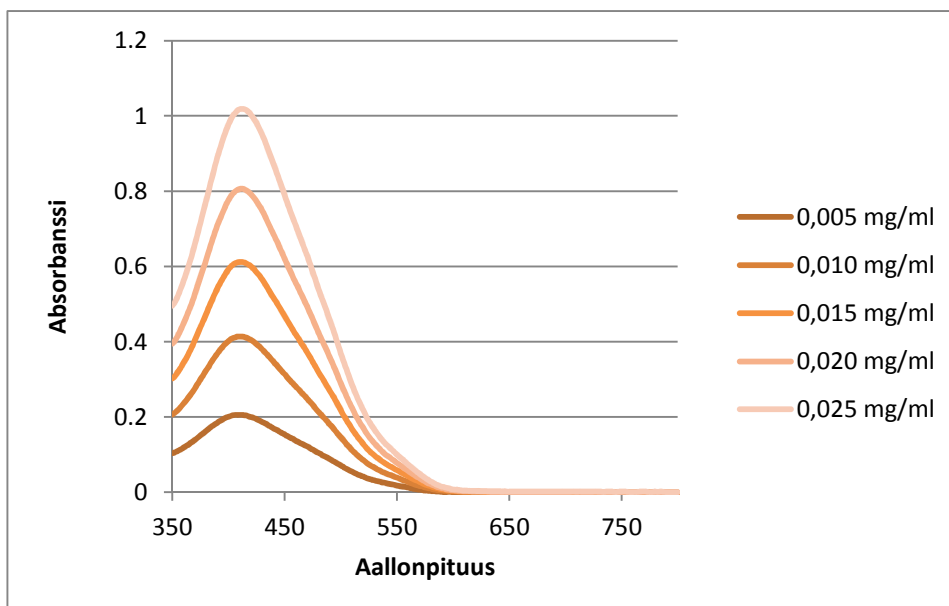


KUVIO 7. Sinisien standardien spektrit

Kuviosta 7 voidaan nähdä miten laimentaminen vaikuttaa absorptiomaksimiin. Pienimmän pitoisuuden piikki on melko laaja, joten absorptiomaksimi ei ole kovin selkeä. Mitä väkevämpi mitattava liuos on, sitä selkeämpi piikki. Kuvion perusteella absorptiomaksimit eivät juuri muutu. Ohjelman antamat absorptiomaksimit on koottu taulukkoon 10.

TAULUKKO 10. Eripitoisten sinisien väriliuosten spektrien absorptiomaksimit

Sininen	
Pitoisuus (mg/ml)	Absorptiomaksimi (nm)
0,005	598
0,0125	598
0,025	598
0,050	596
0,075	594



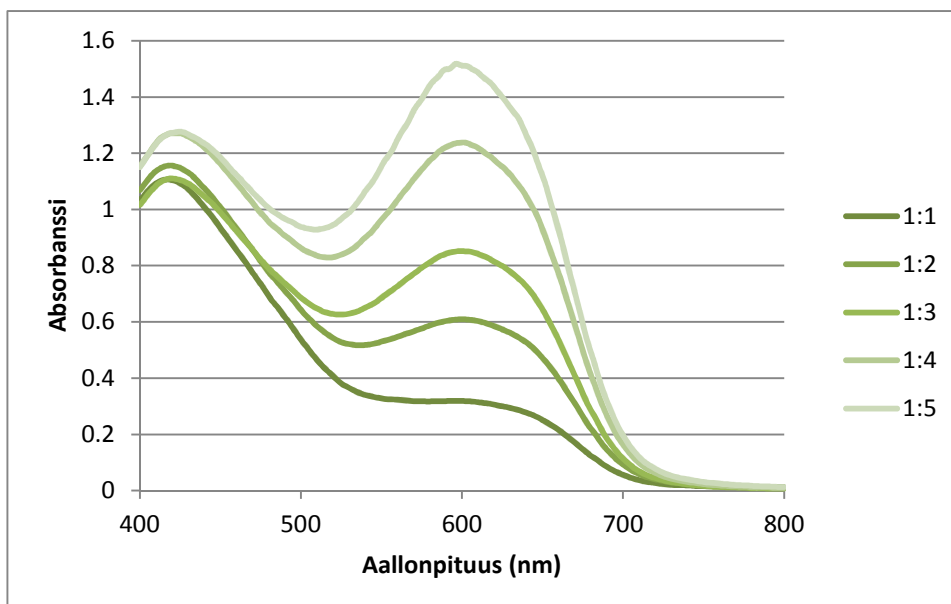
KUVIO 8. Oranssien standardien spektrit

Kuviosta 8 huomataan, että laimentaminen ei vaikuta merkittävästi absorptiomaksimiin. Absorptiomaksimit on koottu taulukkoon 11.

TAULUKKO 11. Eripitoisten oranssien väriliuosten spektrien absorptiomaksimit

Oranssi	
Pitoisuus (mg/ml)	Absorptiomaksimi (nm)
0,005	408
0,010	410
0,020	410
0,025	412
0,050	412

Kuviossa 9 on eri suhteilla tehtyjen seosten spektrit. Oranssin määrä pysyi koko ajan samana, mutta sinisen määrää lisättiin. Tarkoituksena oli löytää suhde, jossa oranssin ja sinisen absorbanssit olivat lähellä toisiaan. Eri seosten absorptiomaksimit ja maksimi absorbanssit ovat taulukossa 12.



KUVIO 9. Eri seosten spektrit

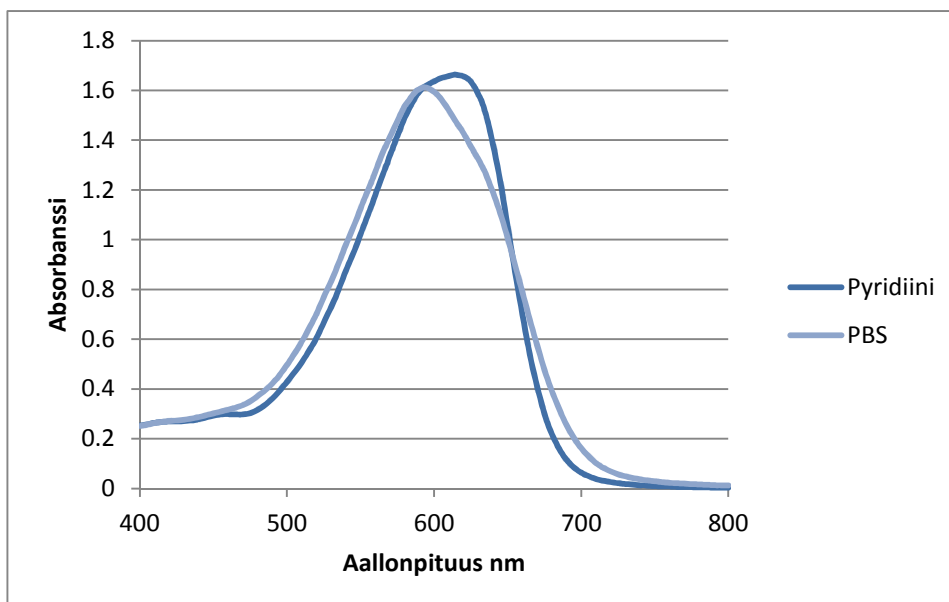
TAULUKKO 12. Eri seosten absorptiomaksimit ja absorbanssit

Seos	Absorptiomaksimi, piikki 1 (nm)	Absorptiomaksimi, piikki 2 (nm)	Absorbanssi, piikki 1	Absorbanssi, piikki 2
1:1	596	418	0,319	1,107
1:2	598	418	0,609	1,156
1:3	598	420	0,852	1,110
1:4	600	420	1,238	1,271
1:5	596	424	1,518	1,276

Kuviosta 9 ja taulukosta 12 havaitaan, että absorbanssit ovat lähimpänä toisiaan 1:4 seoksessa, jossa sinisen maksimi absorbanssi oli 1,238 ja oranssin 1,271.

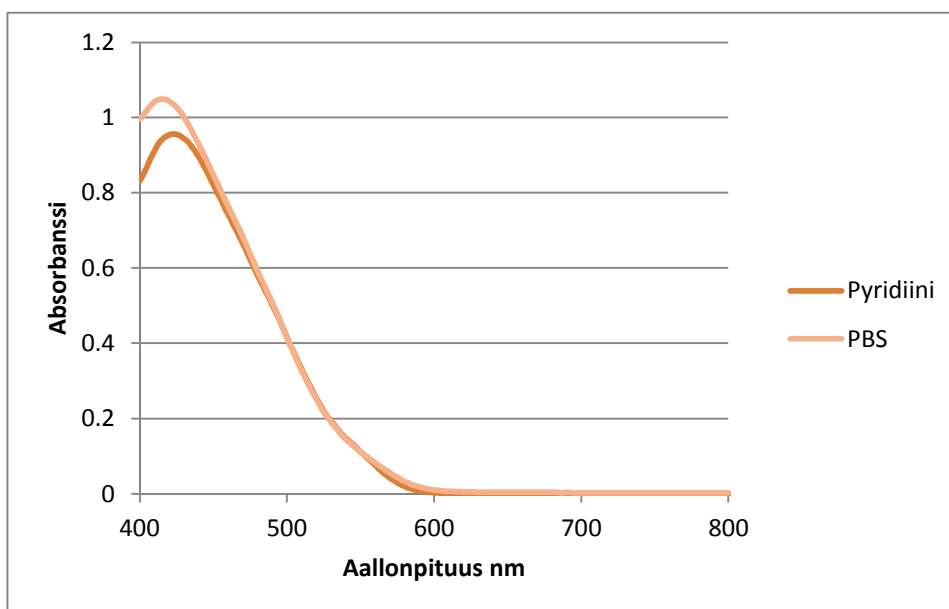
Spektreistä voidaan päätellä, ettei PBS-liuoksella ole suurta vaikutusta värien absorptiomaksimeihin. Kuvioden 7 ja 8 perusteella voidaan myös päätellä, että laimentamisella on vain vähäinen vaikutus absorptiomaksimeihin. Eri seoksista tehtyjen spektrien perusteella värjäyskokeisiin valittiin 1:4-oranssi/sininen-seos.

Pyridiiniä sisältävien liuosten tuloksista piirrettiin spektrit. Samaan kuvioon piirrettiin vertailun helpottamiseksi pyridiiniväriliuoksen lisäksi samanpitoisen PBS-puskuria sisältävän väriliuoksen spektri. Sinisten liuosten spektrit ovat kuviossa 10 ja oranssien kuviossa 11.



KUVIO 10. Spektrit sinisestä pyridiiniväriliuoksesta ja PBS-väriliuoksesta

Kuviosta 10 havaitaan, että pyridiiniä sisältävän sinisen väriliuoksen spektri poikkeaa melko paljon PBS-puskuria sisältävän väriliuoksen spektristä. Pyridiiniväriliuoksen spektri nousee jyrkemmin kuin PBS-puskuria sisältävän väriliuoksen. Pyridiiniväriliuoksen absorptiomaksimi on suurempi kuin PBS-väriliuoksen ja myös absorbanssi on suurempi pyridiiniliuoksella. Spektrien absorptiomaksimit on koottu taulukkoon 13.



KUVIO 11. Spektrit oranssista pyridiiniväriliuoksesta ja PBS-väriliuoksesta

Kuviosta 11 nähdään, että oranssien väriliuosten spektrit poikkeavat toisistaan hieman. Spektrit ovat lähes identtiset aallonpituusalueella 800 – 450 nm, kunnes 450 nm:n jäl-

keen PBS-puskuria sisältävän liuoksen spektri jatkaa nousua, kun pyridiiniväriliuoksen spektri alkaa kaartua. Pyridiiniväriliuoksella on siis suurempi absorptiomaksimi kuin PBS-puskuria sisältävän liuoksen. Absorptiomaksimit on koottu taulukkoon 13. PBS-puskuria sisältävän liuoksen absorbanssi on myös suurempi kuin pyridiiniväriliuoksen.

TAULUKKO 13. Absorptiomaksimit ja absorbanssit pyridiiniliuoksille ja PBS-puskuria sisältäville liuoksille

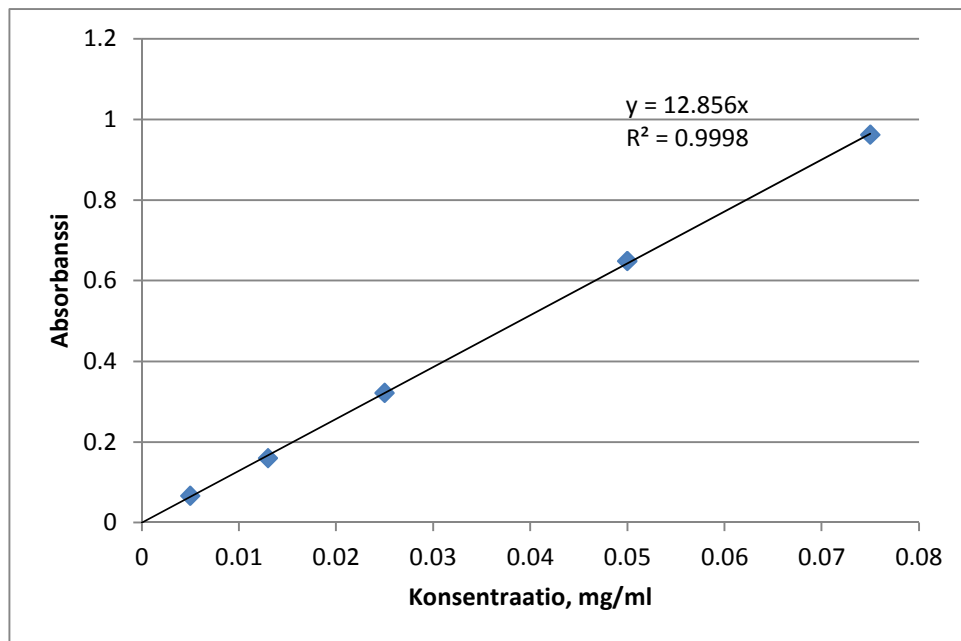
Väri	Pyridiini		PBS	
	Absorptiomaksimi	Absorbanssi	Absorptiomaksimi	Absorbanssi
Sininen	614 nm	1,664	598 nm	1,612
Oranssi	422 nm	0,956	414 nm	1,049

Kirjallisuudessa käytetyt sinisen ja oranssin absorptiomaksimit on määritetty 621,5 nm ja 450 nm (Esteghlalian et al. 2001) sekä 642 nm ja 450 nm (Chandra et al. 2008) aallonpituuksilla. Kokonaan veteen tehtyjen liuosten maksimien aallonpituudet olivat 600 nm ja 412 nm. Pyridiini kasvatti absorptiomaksimien aallonpituuksia jonkin verran, mutta ei kuitenkaan riittävästi, että se olisi selittänyt kirjallisuudessa käytetyt aallonpituudet.

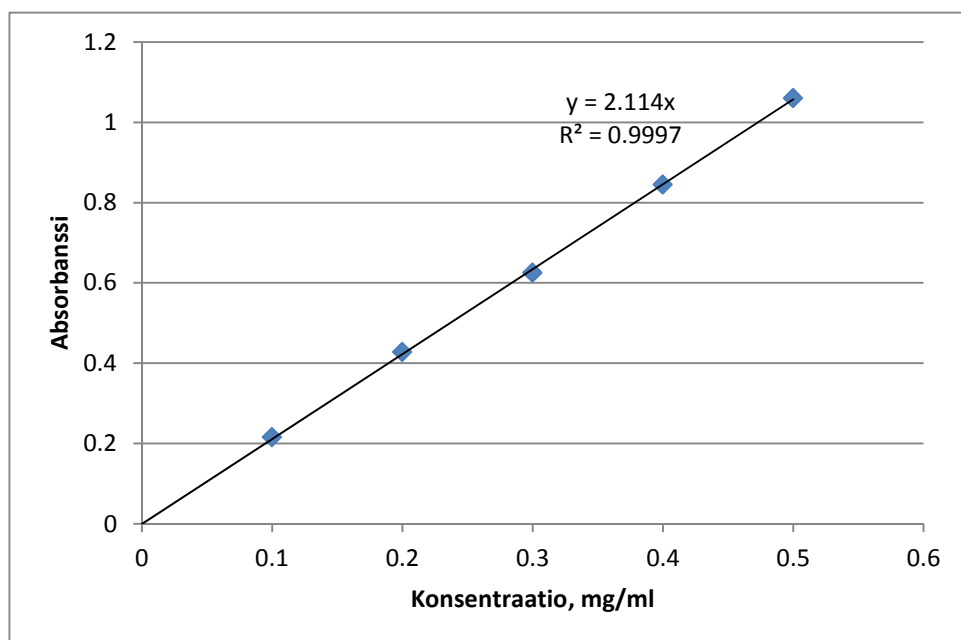
Koska absorptiomaksimit eivät olleet vielääkään samat kuin kirjallisuudessa, päätettiin, ettei pyridiiniä käytetä. Sitä ei haluttu käyttää myöskään sen takia, että se on terveydelle haitallista ja sen käyttäminen on hankalaa voimakkaan hajun takia.

### 3.3.3 Standardisuorat

Kuviossa 12 on siniselle värille aallonpituudella 598 nm tehty standardisuora ja kuviossa 13 on siniselle värille aallonpituudella 414 nm tehty standardisuora. Sinisestä standardisuorasta, joka mitattiin aallonpituudella 598 nm, jätettiin pois pitoisuudet 0,010 mg/ml, 0,100 mg/ml ja 0,125 mg/ml, koska 0,010 mg/ml oli liian lähellä seuraavaa pitoisuutta 0,0125 mg/ml ja muiden pitoisuuksien absorbanssi oli yli 1. Kuvioden standardisuorien korrelaatiokertoimet kertovat, että standardisuorat ovat onnistuneet.

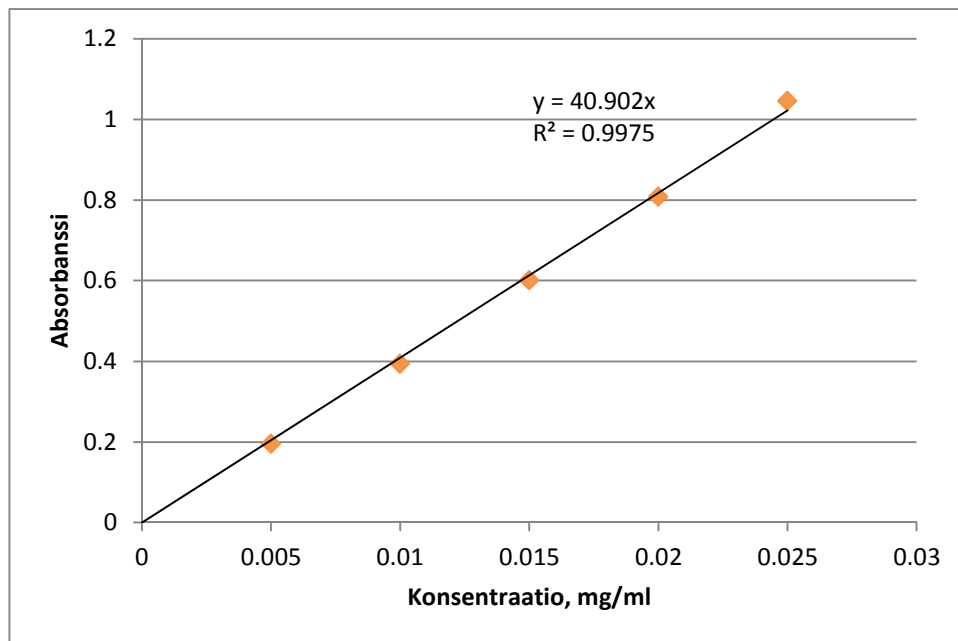


KUVIO 12. Sinisen värin standardisuora aallonpituudella 598 nm

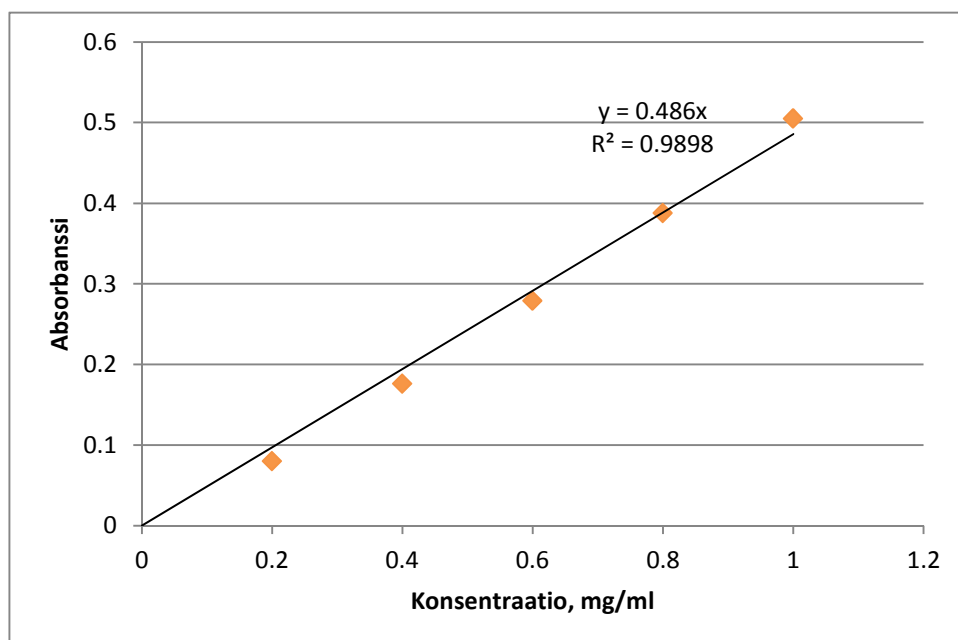


KUVIO 13. Sinisen värin standardisuora oranssin maksimiaallonpituudella (414 nm)

Kuviossa 14 on oranssille aallonpituudella 414 nm tehty standardisuora ja kuviossa 15 on oranssille aallonpituudella 598 nm tehty standardisuora. Oranssista standardisuorasta, joka mitattiin aallonpituudella 414 nm, jätettiin pois pitoisuus 0,050 mg/ml, koska sen absorbanssi oli yli 1. Korrelaatiokertoimista voidaan havaita, että standardit olivat hyviä.



KUVIO 14. Oranssin värin standardisuora aallonpituudella 414 nm



KUVIO 15. Oranssin värin standardisuora sinisen maksimiaallonpituudella (598 nm)

### 3.3.4 Sellujen kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen

Kuiva-ainepitoisuudet sellunäytteille olivat:

- Käsittelemätön sellu 29,46 %
- Mekaanisesti käsitelty sellu 26,37 %

### 3.3.5 Sellunäytteiden värjäys

Tulokset lasketaan absorbansseista kaavoilla 3 ja 4. Laskemista varten tarvitaan standardisuorien kulmakertoimia, jotka on koottu taulukkoon 14.

TAULUKKO 14. Kulmakertoimet Lambert-Beerin lakia varten

Suure	$\epsilon_{O/414\text{ nm}}$	$\epsilon_{B/598\text{ nm}}$	$\epsilon_{O/598\text{ nm}}$	$\epsilon_{B/414\text{ nm}}$
Arvo	40,902	12,856	0,486	2,114

#### 3.3.5.1. Muuttujana sellukonsentraatio

Laimennettujen näytteiden absorbanssit aallonpituuksilla 414 nm ja 598 nm, kun muuttujana on sellukonsentraatio, on koottu taulukkoon 15. Mittauksessa ei tehty rinnakkaisia näytteitä.

TAULUKKO 15. Värjättyjen näytteiden absorbanssit aallonpituuksilla 414 nm ja 598 nm, kun muuttujana oli sellukonsentraatio

Näyte	Sellukonsentraatio (wt%)	Absorbanssi 414 nm	Absorbanssi 598 nm
A1	1	0,864	0,997
A2	0,2	0,976	1,034

Absorbanssien avulla laskettiin värien konsentraatiot (mg/ml) ja sen avulla kuinka monta milligrammaa väriä on adsorboitunut näytteeseen. Oranssin värin pitoisuuden ( $c_o$ ) laskemiseen käytettiin kaavaa 4. Kaikki lasketut tulokset on koottu taulukkoon 16. Näytteen pitoisuus laskettiin seuraavasti:

$$c_o = \frac{A_{414\text{ nm}} \cdot \epsilon_{B/598\text{ nm}} - \epsilon_{B/414\text{ nm}} \cdot A_{598\text{ nm}}}{L(\epsilon_{O/414\text{ nm}} \cdot \epsilon_{B/598\text{ nm}} - \epsilon_{B/414\text{ nm}} \cdot \epsilon_{O/598\text{ nm}})}$$

$$c_o = \frac{0,864 \cdot 13,785 - 2,111 \cdot 0,997}{1(39,1 \cdot 13,785 - 2,111 \cdot 0,531)} \approx 0,018 \text{ mg/ml}$$

$$c_o = 0,018 \text{ mg/ml} \cdot 50 \approx 0,9115 \text{ mg/ml}$$



Oranssia väriä oli liuoksessa siis:

$$0,9115 \text{ mg/ml} \cdot 10 \text{ ml} = 9,115 \text{ mg}$$

Adsorboituneen oranssin värin määrä laskettiin alkuperäisen oranssin määrän ja mitatun oranssin määrän erotuksella:

$$11,25 \text{ mg} - 9,115 \text{ mg} = 2,135 \text{ mg}$$

TAULUKKO 16. Tulokset oranssille värille, kun muuttujana on sellukonsentraatio

Näyte	Sellukonsentraatio (wt%)	Oranssin värin määrä liuoksessa (mg)	Adsorboituneen värin määrä (mg)
A1	1	9,115	2,135
A2	0,2	10,748	0,772

Kaavalla 3 laskettiin sinisen värin pitoisuus. Kaikki tulokset on koottu taulukkoon 17. Näytteen pitoisuus laskettiin seuraavasti:

$$c_B = \frac{A_{598nm} - \epsilon_{O/598nm} \cdot L \cdot c_O}{\epsilon_{B/598nm} \cdot L}$$

$$c_B = \frac{0,997 - 0,531 \cdot 1 \cdot 0,017}{13,785 \cdot 1} \approx 0,072 \text{ mg/ml}$$

$$c_B = 0,072 \text{ mg/ml} \cdot 50 \approx 3,5811 \text{ mg/ml}$$

Sinistä väriä oli liuoksessa:

$$3,5811 \text{ mg/ml} \cdot 10 \text{ ml} = 35,811 \text{ mg}$$

Sinistä väriä adsorboitui kuituun:

$$45 \text{ mg} - 38,4515 \text{ mg} = 9,189 \text{ mg}$$

TAULUKKO 17. Tulokset siniselle värille, kun muuttujana on sellukonsentraatio

Näyte	Sellukonsentraatio (wt%)	Sinisen värin määrä (mg)	Adsorboituneen värin määrä (mg)
A1	1	35,811	9,189
A2	0,2	37,101	7,899

Koska haluttiin tietää, kumpi sellukonsentraatio adsorboi paremmin väriä, laskettiin selluun adsorboituneen oranssin ja sinisen värin summa (taulukko 18).

TAULUKKO 18. Selluun adsorboituneen värin kokonaismäärä

Näyte	Sellukonsentraatio (wt%)	Adsorboituneen värin kokonaismäärä (mg)
A1	1	11,323
A2	0,2	8,671

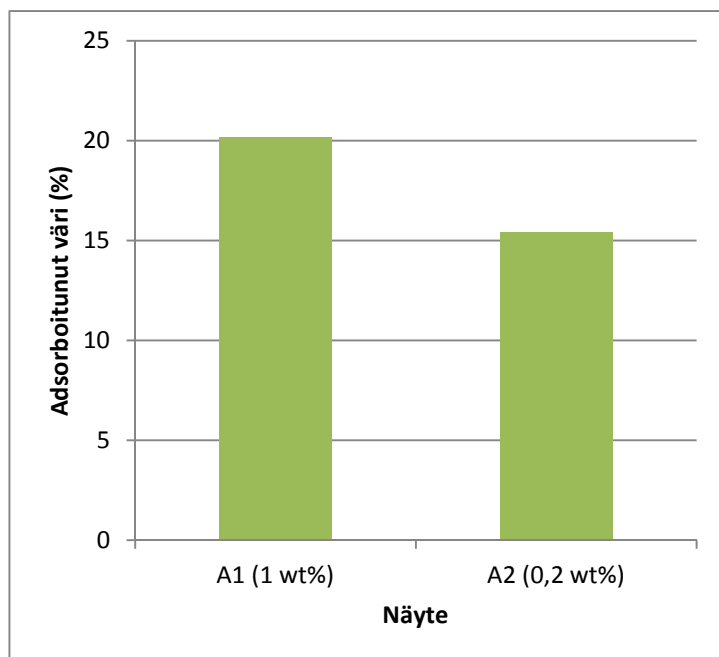
Tuloksien vertailun helpottamiseksi laskettiin selluun adsorboituneen värin määrä prosentteina:

$$\frac{11,323 \text{ mg}}{11,25 \text{ mg} + 45,00 \text{ mg}} \cdot 100\% = 20,13\%$$

Selluun adsorboituneen värin määrä eri näytteille on esitetty taulukossa 19. Näistä tuloksista piirrettiin pylväskaavio (kuvio 16).

TAULUKKO 19. Selluun adsorboitunut väri prosentteina

Näyte	Sellukonsentraatio (wt%)	Adsorboitunut väri (%)
A1	1	20,13
A2	0,2	15,42



KUVIO 16. Selluun adsorboituneen värin määrä, kun muuttujana oli sellukonsentraatio

Kuviosta 16 voidaan havaita, että näyte A1, jossa sellukonsentraatio oli 1 wt%, on adsorboinut enemmän väriä kuin näyte A2, jossa sellunkonsentraatio oli 0,2 w%. Työn perusteella sellunkonsentraatioksi valittiin 1 wt%.

### 3.3.5.2. Muuttujana värin konsentraatio

Laimennettujen näytteiden absorbanssit aallonpituuksilla 414 nm ja 598 nm, kun muuttujana on värin konsentraatio, on koottu taulukkoon 20. Kaikista näytteistä tehtiin rinnakkaiset näytteet, jotka on merkitty taulukkoon samalla näytekoodilla, jossa viimeinen numero vaihtuu.

TAULUKKO 20. Värjättyjen näytteiden absorbanssit aallonpituuksilla 414 nm ja 598 nm, kun muuttujana oli värin konsentraatio

Näyte	Värin konsentraatio (mg/ml)		Absorbanssi 414 nm	Absorbanssi 598 nm
	Oranssi	Sininen		
B1.1	0,625	2,5	0,454	0,596
B1.2	0,625	2,5	0,458	0,598
B2.1	0,284	1,136	0,376	0,506
B2.2	0,284	1,136	0,363	0,494
B3.1	0,625	2,5	0,437	0,574
B3.2	0,625	2,5	0,426	0,565
B4.1	0,284	1,136	0,354	0,478
B4.2	0,284	1,136	0,341	0,469

Oranssin värin pitoisuus laskettiin samalla tavalla kuin kappaleessa 3.3.5.1. Sen avulla laskettiin kuinka monta milligrammaa väriä on adsorboitunut grammaan sellua (mg väriä/g sellua). Kaikki lasketut tulokset on koottu taulukkoon 21.

Selluun adsorboituneen värin määrä  $c_a$  laskettiin kaavalla:

$$c_a = \frac{(c_0 - c) \cdot V}{m} \quad (6)$$

jossa  $c_0$  = näytteeseen lisätyn värin määrä (mg/ml)

$c$  = värin määrä (mg/ml)

$V$  = näytteen tilavuus (ml)

$m$  = näytteen kuivapaino (g)

Adsorboituneen oranssin värin määrä  $c_{Oa}$  oli siis:

$$c_{Oa} = \frac{(0,625 \text{ mg/ml} - 0,465 \text{ mg/ml}) \cdot 10 \text{ ml}}{0,09987 \text{ g}} = 16,039 \text{ mg väriä/g sellua}$$

TAULUKKO 21. Tulokset oranssille värille, kun muuttujana on värin konsentraatio

Näyte	Oranssin värin alkuperäinen pitoisuus (mg/ml)	Oranssin värin pitoisuus näyte-liuoksessa (mg/ml)	Adsorboituneen värin määrä (mg väriä/g sellua)	
			Tulos	Keskiarvo
B1.1	0,625	0,465	16,039	15,800
B1.2	0,625	0,470	15,561	
B2.1	0,284	0,191	10,215	10,602
B2.2	0,284	0,184	10,990	
B3.1	0,625	0,447	17,738	18,376
B3.2	0,625	0,435	19,014	
B4.1	0,284	0,180	11,457	11,868
B4.2	0,284	0,172	12,279	

Taulukkoon 21 on laskettu rinnakkaisten näytteiden keskiarvo adsorboituneen värin määrälle. Rinnakkaiset näytteet onnistuivat melko hyvin, koska niiden erot eivät ole suuria.

Sinisen värin pitoisuus laskettiin samalla tavalla kuin kappaleessa 3.3.5.1. Sen avulla laskettiin kuinka monta milligrammaa väriä on adsorboitunut grammaan sellua (mg väriä/g sellua). Kaikki tulokset on koottu taulukkoon 22.

Adsorboituneen värin määrä laskettiin kaavalla 6, joten  $c_{Ba}$  oli:

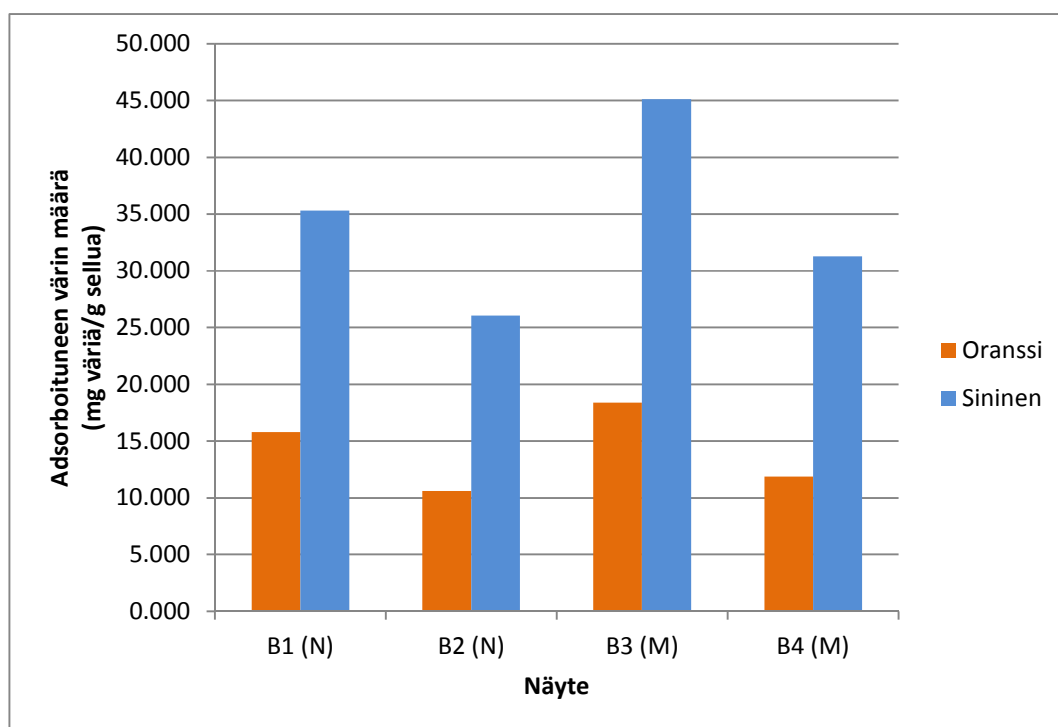
$$c_{Ba} = \frac{(2,5 \text{ ml} - 2,144 \text{ mg/ml}) \cdot 10 \text{ ml}}{0,09987 \text{ g}} = 35,660 \text{ mg väriä/g sellua}$$

TAULUKKO 22. Tulokset siniselle värille, kun muuttujana on värin konsentraatio

Näyte	Sinisen värin alkuperäinen pitoisuus (mg/ml)	Sinisen värin pitoisuus näyte-liuoksessa (mg/ml)	Adsorboituneen värin määrä (mg väriä/g sellua)	
			Tulos	Keskiarvo
B1.1	2,5	2,144	35,660	35,301
B1.2	2,5	2,151	34,942	
B2.1	1,136	0,910	24,878	26,044
B2.2	1,136	0,889	27,210	
B3.1	2,5	2,065	43,459	45,121
B3.2	2,5	2,033	46,782	
B4.1	1,136	0,860	30,399	31,285
B4.2	1,136	0,844	32,171	

Taulukkoon 22 on laskettu rinnakkaisten näytteiden keskiarvo adsorboituneen värin määrälle.

Taulukoiden 21 ja 22 adsorboituneen värin määrän keskiarvoista piirrettiin kuvio 17. Näytteiden B1 ja B2 sellu oli käsittelemätöntä ja näytteiden B3 ja B4 mekaanisesti käsiteltyä.



KUVIO 17. Selluun adsorboituneen värin määrä, kun muuttujana oli värin konsentraatio, suluissa käytetty sellu (N = käsittelemätön sellu, M = mekaanisesti käsitelty sellu). Näytteet B1 ja B3 sisälsivät oranssia 0,625 mg/ml ja sinistä 2,5 mg/ml ja näytteet B2 ja B4 oranssia 0,284 mg/ml ja sinistä 1,136 mg/ml.

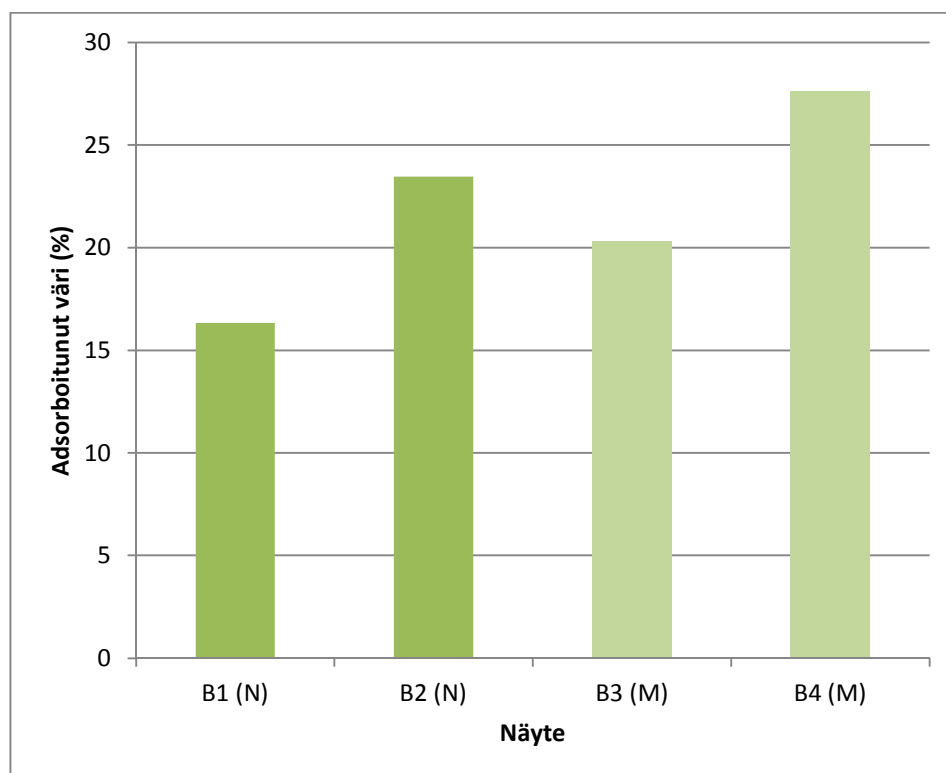
Kuviosta 17 nähdään, että kaikkein väkevimmistä liuoksista (B1 ja B3) adsorboitui eniten väriä selluun. Molemmista näytteistä nähdään selvä lasku adsorboituneen värin määrässä, kun liuoksen värimäärä pienenee.

Eri sellunäytteitä verrattaessa huomataan, että mekaanisesti käsitelty sellu, eli näytteet B3 ja B4, ovat adsorboineet enemmän väriä kuin käsittelemätön sellu, eli B1 ja B2. Erot eivät ole kovin merkittävät, joten tuloksia tutkittiin vielä prosentuaalisesti.

Selluun adsorboituneen värin määrä prosentteina laskettiin kuten kappaleessa 3.3.5.2 ja tulokset on koottu taulukkoon 23. Tuloksista piirrettiin pylväsdiagrammi, joka on kuviossa 18.

TAULUKKO 23. Adsorboituneen värin prosentuaalinen määrä, kun muuttujana oli värin konsentraatio

Näyte	Värin konsentraatio (mg/ml)		Adsorboituneen värin määrä (%)	
	Oranssi	Sininen	Tulos	Keskiarvo
B1.1	0,625	2,5	16,522	16,333
B1.2	0,625	2,5	16,144	
B2.1	0,284	1,136	22,450	23,458
B2.2	0,284	1,136	24,166	
B3.1	0,625	2,5	19,613	20,325
B3.2	0,625	2,5	21,037	
B4.1	0,284	1,136	26,793	27,620
B4.2	0,284	1,136	28,446	



KUVIO 18. Selluun adsorboituneen värin prosentuaalinen määrä, kun muuttujana oli värin konsentraatio, suluissa käytetty sellu (N = käsittelemätön sellu, M = mekaanisesti käsitelty sellu). Näytteet B1 ja B3 sisälsivät oranssia 0,625 mg/ml ja sinistä 2,5 mg/ml ja näytteet B2 ja B4 oranssia 0,284 mg/ml ja sinistä 1,136 mg/ml.

Kuviosta 18 voidaan nähdä, että prosentuaalisesti eniten väriä sellu adsorboi laimeammista liuksista (näytteet B2 ja B4). Absoluuttisesti enemmän väriä adsorboitui väkevistä liuksesta, koska väriä adsorboituu paljon, jos väriä on paljon liuksessa. Mekaa-



nisesti käsitelty sellu adsorboi myös kuvion 18 mukaan enemmän väriä kuin käsittelemättömän sellu.

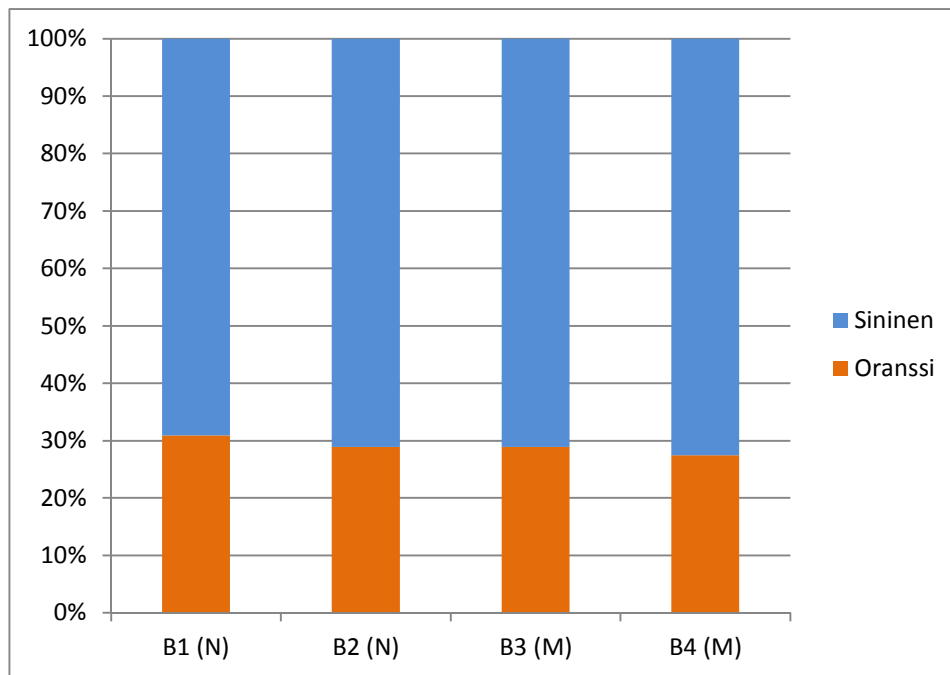
Käsittelemättömään ja mekaanisesti käsiteltyyn selluun adsorboituneen värin määrää verrattiin toisiinsa tutkimalla sinisen ja oranssin värin keskinäisen suhteen muutosta. Kuituun adsorboituneiden värien määrät laskettiin prosentteina:

$$\frac{\text{Adsorboituneen oranssin määrä}}{\text{Adsorboituneen värin kokonaismäärä}} = \frac{1,602 \text{ mg}}{5,163 \text{ mg}} \cdot 100 = 31,0\%$$

Kaikkien näytteiden uudet suhteet on koottu oranssille taulukkoon 24 ja siniselle taulukkoon 25. Taulukoista piirrettiin kuvio

TAULUKKO 24. Värjäyksen jälkeinen suhde oranssille

Näyte	Värin konsentraatio (mg/ml)		Värien suhde, oranssi (%)		Värien suhde, sininen (%)	
	Oranssi	Sininen	Tulos	Keskiarvo	Tulos	Keskiarvo
B1.1	0,625	2,5	31,0	30,9	69,0	69,1
B1.2	0,625	2,5	30,8		69,2	
B2.1	0,284	1,136	29,1	28,9	70,9	71,1
B2.2	0,284	1,136	28,8		71,2	
B3.1	0,625	2,5	29,0	28,9	71,0	71,1
B3.2	0,625	2,5	28,9		71,1	
B4.1	0,284	1,136	27,4	27,5	72,6	72,5
B4.2	0,284	1,136	27,6		72,4	



KUVIO 19. Adsorboituneiden värien suhteet, kun muuttujana oli värin konsentraatio, suluissa käytetty sellu (N = käsittelemätön sellu, M = mekaanisesti käsitelty sellu).

Taulukosta 24 sekä kuviosta 19 havaitaan, että värien suhteissa ei ole suurta eroa eri sellunäytteiden välillä. Molemmat sellut ovat adsorboineet värejä samassa suhteessa, joten niiden huokoskokojakaumat ovat oletettavasti samankaltaiset.

### 3.3.5.3. Muuttujana värjäysaika

Laimennettujen näytteiden absorbanssit aallonpituuksilla 414 nm ja 598 nm, kun muuttujana on värjäysaika, on koottu taulukkoon 26. Kaikille näytteille tehtiin rinnakkaiset näytteet ja ne on merkitty kuten aikaisemminkin.

TAULUKKO 25. Värjättyjen näytteiden absorbanssit aallonpituuksilla 414 nm ja 598 nm, kun muuttujana oli värjäysaika.

Näyte	Absorbanssi 414 nm	Absorbanssi 598 nm
C1.1	0,377	0,490
C1.2	0,371	0,486
C2.1	0,356	0,498
C2.2	0,360	0,504
C3.1	0,365	0,512
C3.2	0,351	0,492
C4.1	0,381	0,488
C4.2	0,351	0,464
C5.1	0,325	0,460
C5.2	0,333	0,466
C6.1	0,342	0,479
C6.2	0,329	0,459

Oranssin värin pitoisuuden laskemiseen suoritettiin samalla tavalla kuin kappaleessa 3.3.5.1 ja adsorboituneen värin määrä kuten kappaleessa 3.3.5.2. Kaikki lasketut tulokset on koottu taulukkoon 27. Laimennuskerroin oli 25.

TAULUKKO 26. Tulokset oranssille värille, kun muuttujana on värjäysaika

Näyte	Värjäysaika (min)	Oranssin värin pitoisuus (mg/ml)	Adsorboituneen värin määrä (mg väriä/g sellua)	
			Tulos	Keskiarvo
C1.1	0	0,193	9,96	10,15
C1.2	0	0,190	10,34	
C2.1	30	0,179	11,52	11,42
C2.2	30	0,181	11,31	
C3.1	60	0,183	11,04	11,43
C3.2	60	0,177	11,81	
C4.1	0	0,196	9,65	10,59
C4.2	0	0,179	11,52	
C5.1	30	0,163	13,30	13,05
C5.2	30	0,168	12,79	
C6.1	60	0,172	12,31	12,66
C6.2	60	0,166	13,00	

Taulukkoon 27 on laskettu rinnakkaisten näytteiden keskiarvo adsorboituneen värin määrälle. Suurin osa rinnakkaisista onnistui hyvin, muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta.

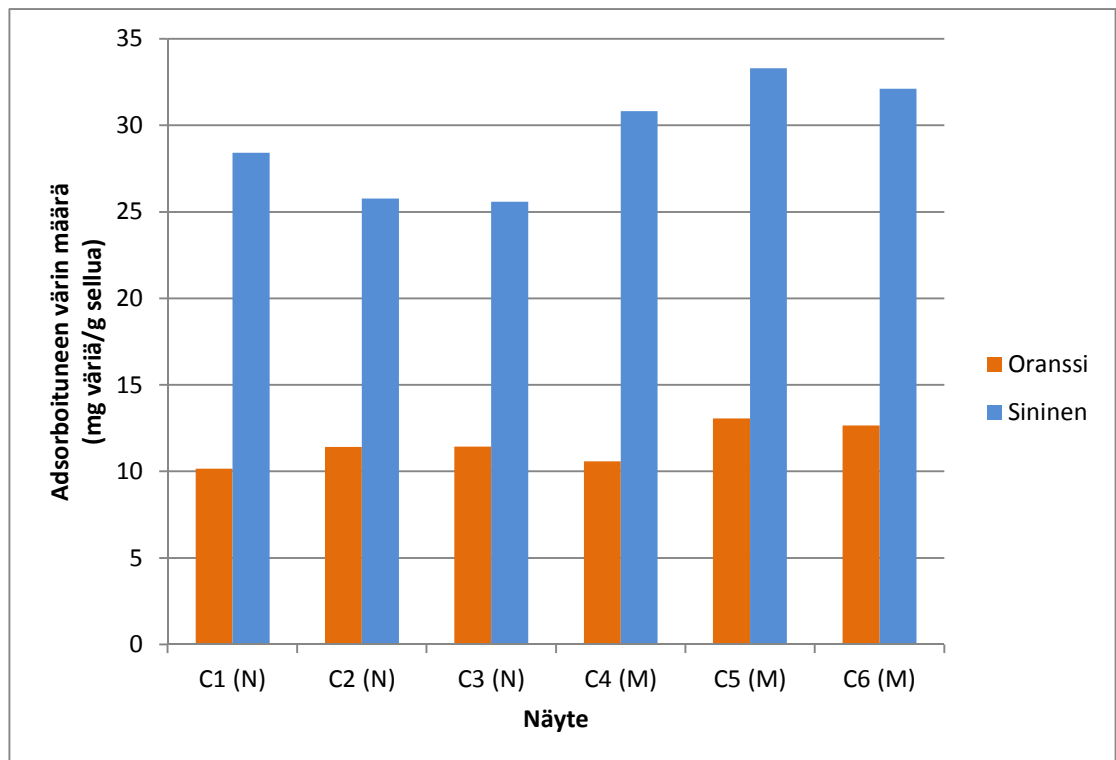
Sinisen värin pitoisuus laskettiin samalla tavalla kuin kappaleessa 3.3.5.1 ja adsorboituneen värin määrä kuten kappaleessa 3.3.5.2. Kaikki tulokset on koottu taulukkoon 28.

TAULUKKO 27. Tulokset siniselle värille, kun muuttujana on värjäysaika

Näyte	Värjäysaika (min)	Sinisen värin pitoisuus (mg/ml)	Adsorboituneen värin määrä (mg väriä/g sellua)	
			Tulos	Keskiarvo
C1.1	0	0,881	28,03	28,42
C1.2	0	0,874	28,81	
C2.1	30	0,896	26,37	25,78
C2.2	30	0,907	25,18	
C3.1	60	0,921	23,60	25,58
C3.2	60	0,885	27,56	
C4.1	0	0,877	28,44	30,81
C4.2	0	0,835	33,17	
C5.1	30	0,828	33,89	33,29
C5.2	30	0,839	32,69	
C6.1	60	0,862	30,13	32,11
C6.2	60	0,826	34,09	

Taulukkoon 28 on laskettu rinnakkaisten näytteiden keskiarvot. Joidenkin rinnakkaisten näytteiden tulokset poikkeavat toisistaan huomattavasti, joten tuloksien oikeellisuus on kyseenalaista. Värjäyksiä ei ehditty uusia tämän työn puitteissa.

Taulukoiden 27 ja 28 adsorboituneen värin määrän keskiarvoista piirrettiin kuvio 19. Näytteiden C1 – C3 sellu oli käsittelemätöntä ja näytteiden C4 – C6 mekaanisesti käsiteltyä.



KUVIO 20. Adsorboituneen värin määrä, kun muuttujana oli värjäysaika, suluissa käytetty sellu (N = käsittelemätön sellu, M = mekaanisesti käsitelty sellu).

Kuviosta 20 nähdään, että näytteillä C1 – C2 adsorboituneen sinisen määrä laskee ajan myötä ja oranssin määrä nousee. Näytteistä C4 – C6 ei pysty havaitsemaan selkeää laskevaa eikä nousevaa trendiä. Eniten väriä on adsorboinut näyte C5, jossa mekaanisesti käsiteltyä sellua värjättiin 30 minuuttia.

Työn perusteella nähdään, että jo 30 minuutin värjäysajalla saadaan keskihajonnan puitteissa sama tulos kuin 60 minuutin värjäysajalla. Värien adsorptio on hyvin nopea tapahtuma ja tulosten perusteella valittiin värjäysajaksi 60 minuuttia.

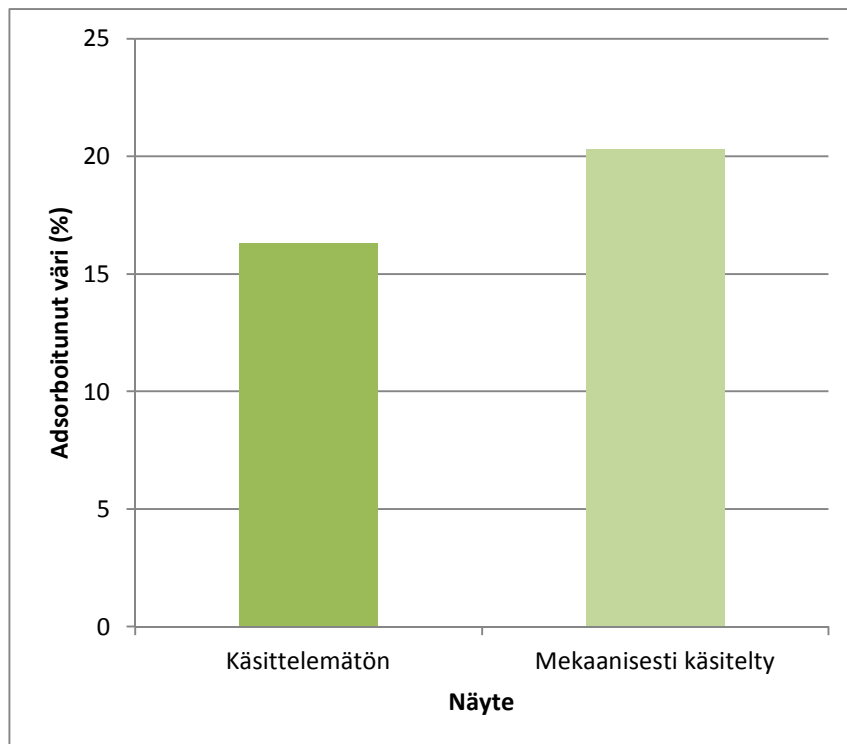
#### 4 SELLUNÄYTTEIDEN VÄRJÄYSTULOSTEN YHTEENVETO

Kun muuttujana oli sellukonsentraatio, tulokseksi saatiin, että sellukonsentraatio 1 wt% on parempi kuin 0,2 wt%. Suurempi sellukonsentraatio adsorboi prosentuaalisesti enemmän väriä kuin pienempi.

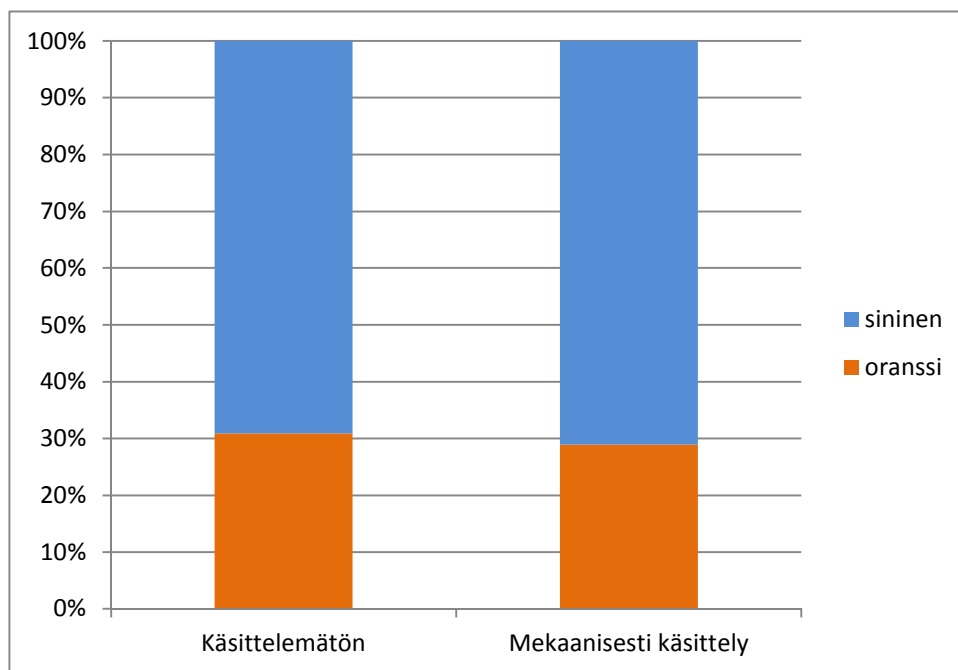
Kun muuttujana oli värin konsentraatio, tulokset osoittivat, että laimeammasta värikonsentraatiosta adsorboituu enemmän väriä selluun. Värjäyksen parametrit eivät olleet parhaat mahdolliset, joten niitä tulisi muokata parempien tuloksien saamiseksi. Se on tärkeää, koska liemisuhde, eli värjäysliuoksen ja sellun määrän suhde, on yksi tärkeimmistä parametreista värjäysprosessissa.

Kun muuttujana oli värjäysaika, tulokseksi saatiin, että 60 minuutin värjäysaika on riittävä. Selluun adsorboitui jokaisella värjäysajalla keskihajonnan puitteissa sama määrä väriä.

Verrattaessa mekaanisesti käsiteltyä ja käsittelemätöntä sellua, suurta eroa ei havaittu näytteiden välillä. Mekaanisesti käsitelty sellu adsorboi hieman enemmän väriä kuin käsittelemätön (kuvio 20), mutta oranssin ja sinisen värin suhteeseen ei saatu mitään eroa (kuvio 21). Tästä voidaan päätellä, että mekaaninen käsittely suurentaa huokosia, mutta ei niin merkittävästi, että se näkyisi värien suhteessa. Mekaaninen käsittely mahdollisesti vain lisää huokosten määrää, mutta ei suurennakaan niitä. Kuvioissa 21 ja 22 ovat näytteet B1 ja B3.



KUVIO 21. Käsittelemättömään ja mekaanisesti käsiteltyyn selluun adsorboituneen värin määrä prosentteina



KUVIO 22. Värjäyksen jälkeisen värien suhteet käsittelemättömällä ja mekaanisesti käsitellyllä sellulla prosentteina



## 5 POHDINTA

Tässä opinnäytetyössä tutkittiin mahdollisuutta käyttää modifioitua Simons' Staining-menetelmää selluloosanäytteiden analysoimiseen. Tällä hetkellä ei ole nopeaa menetelmää, jolla voitaisiin arvioida sellumateriaalin soveltuvuutta entsymaattiseen käsittelyyn. Koska aikaisempien tutkimusten perusteella tiedetään, että mekaanisesti käsitellyllä sellulla on suurempi alttius entsymaattiselle pilkkoutumiselle kuin käsittelemättömällä sellulla, haluttiin selvittää saadaanko modifioidulla Simons' Staining-menetelmällä ero näiden sellujen välille.

Työn tekemisen aikana kohdattiin useita ongelmia, kuten absorptiomaksimien poikkeaminen kirjallisuuden arvoista, väriliuosten pipetoiminen, rinnakkaisten näytteiden suuret erot, värien pitoisuuksien määrittäminen ja hyvin pienet erot näytteiden välillä. Kokonaisuuden hahmottaminen ja hallitseminen oli koko ajan haastavaa, koska värjäyksissä oli niin paljon muuttujia ja avoimia kysymyksiä.

Väkevien väriliuosten hankala pipetoiminen huomattiin siitä, että väriä jäi jatkuvasti automaattipipetin kärkeen, jolloin näytteen värimäärästä ei koskaan ollut varmuutta. Ongelma ratkaistiin tarkastamalla jokainen pipetointimäärä punnitsemalla, joka puolestaan hidasti näytteenkäsittelyä. Työn aikana huomattiin, että laimeampia väriliuoksia oli helpompi pipetoida, koska tällöin väriä ei jäänyt pipetinkärkeen. Jatkossa olisi järkevämpää laimentaa väriliuos suoraan haluttuun värjäysliuoksen konsentraatioon, jolloin väriliuos on laimeampi ja helpompi pipetoida.

Hankaluuksia aiheutti myös pohjatietona käytettyjen artikkelien työnkuvauksien osittainen puutteellisuus. Esimerkiksi Chandra, Ewanick, Hsieh ja Saddler (2008) eivät kerro onko absorptiomaksimit mitattu pyridiiniä sisältävästä väriliuoksesta vai vettä ja PBS-puskuria sisältävästä väriliuoksesta. Tämän työn perusteella värjäysliuoksen liuottimella on suuri merkitys absorptiomaksimeihin. Chandra, Ewanick, Hsieh ja Saddler (2008, 1180) käyttivät aallonpituuksia 455 nm ja 624 nm sekä pyridiiniä sisältäviin ja sisältämättömiin näytteisiin, kun taas tässä työssä pyridiiniä sisältävien liuosten absorptiomaksimit olivat 614 nm ja 422 nm sekä vettä ja PBS-puskuria sisältävien liuosten olivat 598 nm ja 414 nm.

Tehtyjen kokeiden perusteella modifioitu Simons' Staining-menetelmä ei toimi odotetulla tavalla. Ennakko-oletuksena oli, että menetelmällä havaittaisiin huokoskoon muutos mekaanisen käsittelyn jälkeen, mutta erot mekaanisesti käsitellyn ja käsittelemättömän sellun välillä olivat hyvin pienet. Erityisesti odotettiin, että mekaanisesti käsitelty sellu olisi adsorboinut enemmän oranssia väriä, joka olisi indikoinut huokoskoon suurentumista. Syy erojen pienuuteen voisi olla modifioidun SS-menetelmän toimivuuden lisäksi se, ettei mekaaninen käsittely nosta vain suurien huokosten määrää vaan samalla myös pienten huokosten määrää.

Modifioidun SS-menetelmän ongelmana on se, että sen perustana on tarkka tieto käytettävien väriliuosten pitoisuuksista. Työn aikana huomattiin, että väriliuosten tarkan pitoisuuden määrittäminen kuivaamalla on erittäin haastavaa, koska punnittavat määrät olivat pieniä ja herkkiä virheille. Rinnakkaisten näytteiden hajonta oli pahimmillaan erittäin suurta ja määrittäminen jouduttiin monesti tekemään useammin kuin kerran.

Menetelmän testaus jatkuu tämän työn valmistumisen jälkeen. Seuraavaksi menetelmällä kannattaisi värjätä erityyppisiä sellunäytteitä kuten mikrokiteistä sellua, jolloin selviäisi miten värjäystulokset poikkeavat jo värjäytyistä. Toinen mahdollinen testi olisi värjätä kuivattuja sellunäytteitä. Kuivaamisen tiedetään aiheuttavan selluun hornifikaatiota eli huokosten pysyvän romahtamisen, jolloin värien adsorption tulisi pienentyä merkittävästi. Myös värien affiniteettia selluun voisi testata värjäämällä sellunäytteitä yksittäisillä väreillä. Jo värjäytyissä näytteissä käytettiin 1:4 väriseosta, jossa sinistä väriä on huomattavasti enemmän kuin oranssia. Seos valittiin siksi, koska tässä seoksessa maksimiabsorbanssit olivat lähimpänä toisiaan. Jos sinisen suuri määrä vaikeuttaa oranssin värin adsorboitumista kuituun, se voidaan havaita muuttamalla värien suhteita.

## LÄHTEET

Boncamper, I. 2004. Tekstiilioppi, kuituraaka-aineet. 2. korjattu painos. Hämeenlinna: Hämeen ammattikorkeakoulu

Chandra, R., Ewanick, S., Hsieh, C. & Saddler J. N. 2008. The Characterization of Pre-treated Lingocellulosic Substrates Prior to Enzymatic Hydrolysis, Part 1: A Modified Simons' Staining Technique. Teoksessa *Biotechnology progress* 24. Hoboken, Yhdysvallat: Wiley-Blackwell, 1178 - 1185

Esteghlalian, A. R., Bilodeau, M., Mansfield, S. D. & Saddler J. N. 2001. Do Enzymatic Hydrolyzability and Simons' Stain Reflect the Changes in the Accessibility of Lingocellulosic Substrates to Cellulase Enzymes? Teoksessa *Biotechnology progress* 17. Hoboken, Yhdysvallat: Wiley-Blackwell, 1049 - 1054

Harris, D. C. 1999. Quantitative Chemical Analysis. 5. painos. New York, Yhdysvallat: W. H. Freeman and Company

Hearle, J. W. S. 2001. Physical structure and fibre properties. Teoksessa Woodings, C. (toim.) *Regenerated cellulose fibres*. Manchester, Iso-Britannia: The Textile Institute

Hitachi. 2011 Instruction manual, Model U-5100 ratio beam spectrophotometer. 4. Painos. Tokyo, Japan: Hitachi High-Technologies Corporation

Hitachi. 2012. Ratio Beam Spectrophotometer U-5100. [pdf] Luettu 03.08.2012 [http://193.218.17.133/ex/downloads/brochures/hitachi/U\\_5100\\_hitachi.pdf](http://193.218.17.133/ex/downloads/brochures/hitachi/U_5100_hitachi.pdf)

Isotalo, K. 2004. Puu- ja sellukemia. 3. uudistettu painos. Helsinki: Opetushallitus

Klemm, D., Philipp, B., Heinze, T., Heinze, U. & Wagenknecht, W. 1998. *Comprehensive Cellulose Chemistry. Volume 1 Fundamentals and Analytical Methods*. Weinheim, Saksa: Wiley-VCH

Phosphate buffer 2012. Luettu 30.10.2012 [http://www.docstoc.com/docs/104330248/Phosphate-buffer-lab-\\_pp-29-42\\_](http://www.docstoc.com/docs/104330248/Phosphate-buffer-lab-_pp-29-42_)

Sjöström, E. 1989. Puukemia, Teoreettiset perusteet ja sovellutukset. 4. tarkistettu painos. Otakustantamo

Valste, J., Airamo, S., Holopainen, M., Koivisto, I., Suominen, T. & Viitanen, P. 2001. *Elämä*. 1. – 5. painos. Helsinki: WSOY

Vehviläinen, M., Kamppuri, T., Rom, M., Janicki, J., Ciechańska, D., Grönqvist, S., Siika-Aho, M., Elg Christoffersson, K. & Nousiainen, P. 2008. Effect of wet spinning parameters on the properties of novel cellulosic fibres. Teoksessa *Cellulose Volume 15, Issue 5*. Springer.

Yu, X. & Atalla R. H. 1998. A staining technique for evaluating the pore structure variations of microcrystalline cellulose powders. Teoksessa Seville, J. P. K. (toim.) *Powder Technology* 98. Amsterdam, Alankomaat: Elsevier, 135 - 138

## LIITTEET

### Liite 1. PBS-puskurin valmistus

1(2)

TAULUKKO 28. PBS-puskurin fosfaattien suhteet tietyssä pH:ssa (Phosphate buffer 2012)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (%)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (%)	pH
93,5	6,5	5,7
92,0	8,0	5,8
90,0	10,0	5,9
<b>87,7</b>	<b>12,3</b>	<b>6,0</b>
85,0	15,0	6,1
81,5	18,5	6,2
77,5	22,5	6,3
73,5	26,5	6,4
68,5	31,5	6,5
62,5	37,5	6,6
56,5	43,5	6,7
51,0	49,0	6,8
45,0	55,0	6,9
39,0	61,0	7,0
33,0	67,0	7,1
28,0	72,0	7,2
23,0	77,0	7,3
19,0	81,0	7,4
16,0	84,0	7,5
13,0	87,0	7,6
10,5	89,5	7,7
8,5	91,5	7,8
7,0	93,0	7,9
5,3	94,7	8,0

Työhön tehtiin PBS-puskuri, jonka pH on 6 ja sisälsi 0,3 M PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>:a ja 1,4 mM NaCl:a. Taulukosta valitaan haluttu pH eli 6,0, joten NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:a tarvitaan 87,7 % ja Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>:a 12,3 %. Lasketaan kuinka paljon 1 M PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>:a tarvitaan 100 ml PBS-puskuria:

$$c_1 V_1 = c_2 V_2$$

$$1 \text{ M} \cdot x = 0,3 \text{ M} \cdot 100 \text{ ml}$$

$$x = 30 \text{ ml}$$

Tästä määrästä 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:a on:

$$0,877 \cdot 30 \text{ ml} = 26,31 \text{ ml}$$

(jatkuu)

2(2)

Ja 1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ :a:

$$0,123 \cdot 30 \text{ ml} = 3,69 \text{ ml}$$

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -liuoksen konsentraatio oli kuitenkin 0,4 M, joten sitä tarvittiin:

$$0,4 \text{ M} \cdot x = 1 \text{ M} \cdot 3,69 \text{ ml}$$

$$x = 9,225 \text{ ml}$$

5 M  $\text{NaCl}$ -liuosta tarvittiin:

$$5 \text{ M} \cdot x = 0,0014 \text{ M} \cdot 100 \text{ ml}$$

$$x = 0,028 \text{ ml} = 28 \mu\text{l}$$

PBS-puskurin valmistettiin seuraavasti:

- Pipetoitiin dekanterilasiin:
  - 26,31 ml 1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
  - 9,225 ml 0,4 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
  - 28  $\mu\text{l}$  5 M  $\text{NaCl}$
- Lisättiin noin 55 ml ionivaihdettua vettä
- Mitattiin pH ja säädettiin 6:een 1 M  $\text{NaOH}$ :lla, koska pH oli alle 6.
- Siirrettiin liuos 100 ml mittapulloon ja täytettiin merkkiin ionivaihdetulla vedellä.

## Liite 2. PBS-puskurin kanssa tehtyjen väriliuosten reseptit

1(2)

Yksittäinen väriliuos:	1 ml PBS-puskuria 0,25 ml väriliuosta, jonka pitoisuus 10 mg/ml 8,75 ml ionivaihdettua vettä Värin pitoisuus 0,25 mg/ml
1:1 seos:	1 ml PBS-puskuria 0,25 ml oranssia väriä, jonka pitoisuus 10 mg/ml 0,25 ml sinistä väriä, jonka pitoisuus 10 mg/ml 8,5 ml ionivaihdettua vettä Oranssin pitoisuus 0,25 mg/ml, sinisen pitoisuus 0,25 mg/ml
1:2 seos:	1 ml PBS-puskuria 0,25 ml oranssia väriä, jonka pitoisuus 10 mg/ml 0,50 ml sinistä väriä, jonka pitoisuus 10 mg/ml 8,25 ml ionivaihdettua vettä Oranssin pitoisuus 0,25 mg/ml, sinisen pitoisuus 0,50 mg/ml
1:3 seos:	1 ml PBS-puskuria 0,25 ml oranssia väriä, jonka pitoisuus 10 mg/ml 0,75 ml sinistä väriä, jonka pitoisuus 10 mg/ml 8 ml ionivaihdettua vettä Oranssin pitoisuus 0,25 mg/ml, sinisen pitoisuus 0,75 mg/ml
1:4 seos:	1 ml PBS-puskuria 0,25 ml oranssia väriä, jonka pitoisuus 10 mg/ml 1 ml sinistä väriä, jonka pitoisuus 10 mg/ml 7,75 ml ionivaihdettua vettä Oranssin pitoisuus 0,25 mg/ml, sinisen pitoisuus 1,00 mg/ml

(jatkuu)

2(2)

1:5 seos:

1 ml PBS-puskuria

0,25 ml oranssia väriä, jonka pitoisuus 10 mg/ml

1,25 ml sinistä väriä, jonka pitoisuus 10 mg/ml

7,5 ml ionivaihdettua vettä

Oranssin pitoisuus 0,25 mg/ml, sinisen pitoisuus 1,25 mg/ml

Liite 3. Sellunäytteiden kuiva-ainepitoisuuden määrittäminen

TAULUKKO 29. Käsittelemättömän (N) ja mekaanisesti käsitellyn (M) sellun kuiva-ainepitoisuuksien määrittäminen

Näyte	Astia (g)	Märkä näyte (g)	Astia + kuivattu näyte (g)	Kuiva-ainepitoisuus (%)	Keskiarvo
N1	5,0264	4,8313	6,4419	29,2985	29,4575
N2	5,0235	6,5240	6,9386	29,3547	
N3	7,8705	5,4897	9,5020	29,7193	
M1	7,9796	6,0681	9,5683	26,1812	26,3658
M2	7,9827	5,1082	9,3438	26,6454	
M3	7,8670	5,9983	9,4428	26,2708	



Liite 4. Reagenssien määrät, kun muuttujana on sellukonsentraatio.

TAULUKKO 30. Reagenssien määrät, kun muuttujana on sellukonsentraatio

Näytteen numero	Sellu	Sellua märkänä (mg)	Sellua kuivana (mg)	PBS (ml)	1:4 väriliuos (ml)	Vesi (ml)	Kokonais-tilavuus (ml)	Oranssin määrä (mg/ml)	Sinisen määrä (mg/ml)
A1	N	337,5	99,43	1	9	0	10	1,125	4,5
A2	N	68,1	20,06	1	9	0	10	1,125	4,5

Liite 5. Reagenssien määrät, kun muuttujana on värin konsentraatio.

TAULUKKO 31. Reagenssien määrät, kun muuttujana on värin konsentraatio

Näytteen numero	Sellu	Sellua märkänä (mg)	Sellua kuivana (mg)	PBS (ml)	1:4 väriuos (ml)	Vesi (ml)	Kokonaistilavuus (ml)	Oranssin määrä (mg/ml)	Sinisen määrä (mg/ml)
B1.1	N	339,0	99,87	1	5	4	10	0,625	2,5
B1.2	N	339,1	99,90	1	5	4	10	0,625	2,5
B2.1	N	339,3	99,96	1	2,5	7,5	11	0,284	1,136
B2.2	N	339,7	100,08	1	2,5	7,5	11	0,284	1,136
B3.1	M	379,8	100,15	1	5	4	10	0,625	2,5
B3.2	M	378,8	99,92	1	5	4	10	0,625	2,5
B4.1	M	379,3	100,02	1	2,5	7,5	11	0,284	1,136
B4.2	M	379,2	100,00	1	2,5	7,5	11	0,284	1,136

Pienemmillä värikonsentraatioilla vettä pipetoitiin liikaa, jolloin kokonaistilavuus oli 11 ml 10 ml sijaan. Tällä ei ollut suurta vaikutusta tuloksiin.

Liite 6. Reagenssien määrä, kun muuttujana on värjäysaika.

TAULUKKO 32. Reagenssien määrä, kun muuttujana on värjäysaika

Näytteen numero	Sellu	Sellua märkänä (mg)	Sellua kuivana (mg)	Värjäysaika (min)	PBS (ml)	1:4 väri-liuos (ml)	Vesi (ml)	Kokonais-tilavuus (ml)	Oranssin määrä (mg/ml)	Sinisen määrä (mg/ml)
C1.1	N	339,4	99,99	0	1	2,5	7,5	11	0,284	1,136
C1.2	N	339,6	100,05	0	1	2,5	7,5	11	0,284	1,136
C2.1	N	339,7	100,08	30	1	2,5	7,5	11	0,284	1,136
C2.2	N	339,3	99,96	30	1	2,5	7,5	11	0,284	1,136
C3.1	N	339,4	99,99	60	1	2,5	7,5	11	0,284	1,136
C3.2	N	339,3	99,96	60	1	2,5	7,5	11	0,284	1,136
C4.1	M	379,2	100,00	0	1	2,5	7,5	11	0,284	1,136
C4.2	M	379,0	99,94	0	1	2,5	7,5	11	0,284	1,136
C5.1	M	379,2	100,00	30	1	2,5	7,5	11	0,284	1,136
C5.2	M	379,4	100,05	30	1	2,5	7,5	11	0,284	1,136
C6.1	M	379,2	100,00	60	1	2,5	7,5	11	0,284	1,136
C6.2	M	379,3	100,02	60	1	2,5	7,5	11	0,284	1,136

